

---

# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

---

## SUR LE MÉCANISME DE L'IMMUNITÉ CONTRE LA SEPTICÉMIE VIBRIONNIENNE

PAR FÉLIX MESNIL

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff, à l'Institut Pasteur).

---

On ne conteste plus guère le rôle prépondérant que joue la phagocytose dans l'immunité naturelle.

Il n'en est pas encore de même en ce qui regarde l'immunité acquise. Tout le monde admet bien que les phagocytes ont un rôle dans la défense de l'organisme rendu réfractaire ; mais, pour certains savants, ce rôle est tout à fait secondaire ; ce sont des influences humorales qui détruisent, transforment ou atténuent les microbes, c'est-à-dire les mettent au moins en état d'infériorité marquée dans leur lutte contre l'organisme doué d'immunité.

Dans ces dernières années, de nombreuses recherches ont porté sur la maladie septicémique produite par les inoculations intra-abdominales du vibrion cholérique, et ont conduit à des faits très intéressants. C'est ainsi que M. Pfeiffer<sup>1</sup> a découvert ce phénomène si curieux, auquel son nom restera attaché, d'une transformation rapide en boules des vibrions cholériques, en dehors des cellules, chez l'animal immunisé. C'est ainsi que MM. Gruber et Durham<sup>2</sup> ont insisté sur la grande généralité de ce fait, déjà découvert par plusieurs savants, que le sérum des vaccinés a, vis-à-vis du vibrion cholérique qui a servi à

1. R. PFEIFFER. *Zeitschr. f. Hyg.* 1894, t. XVIII, p. 1.

2. GRUBER et DURHAM. Voir surtout *Wiener med. Woch.*, nos 41 et 42, 1896.

l'immunisation, un pouvoir immobilisant et agglutinant tout à fait caractéristique.

Ces savants ont voulu déduire, des faits observés, deux catégories de conséquences :

1<sup>o</sup> Un moyen de diagnostiquer la valeur cholérigène d'un vibrion par une réaction très simple ;

2<sup>o</sup> Une explication purement humorale de l'immunité active et de l'immunité passive des animaux contre le vibrion cholérique.

La première conséquence a été examinée avec soin et critiquée par plusieurs savants, en particulier par M. J. Bordet <sup>1</sup>.

Quant à la question de l'immunité, les tentatives d'explication de M. R. Pfeiffer, d'une part, de MM. Gruber et Durham de l'autre, sont basées sur des expériences faites dans le péritoine, c'est-à-dire dans un milieu très spécial, où il existe un liquide avec beaucoup de globules blancs, et où les circonstances les plus diverses peuvent influer sur le nombre et l'état de ces cellules.

Avant de tirer des conclusions doctrinales des faits observés dans le péritoine, il est donc nécessaire de rechercher leur degré de généralité. — M. Metchnikoff <sup>2</sup> a déjà nettement précisé les conditions très spéciales dans lesquelles se produit le phénomène de Pfeiffer, et réduit à sa juste valeur son importance.

Je me suis proposé d'étudier la maladie septicémique produite par les vibrions cholériques en faisant des inoculations sous-cutanées, afin de rechercher quels étaient, dans la réaction de l'organisme, les phénomènes communs avec ceux observés dans le péritoine, en d'autres termes les phénomènes qui doivent avoir une grande importance pour l'immunité.

J'ai choisi les inoculations sous-cutanées, car le virus est ainsi introduit en des points où il n'existe normalement ni humeurs ni leucocytes, ni rien qui vienne troubler les résultats.

Des recherches semblables ont déjà été faites pour le vibrion cholérique et les vibrions voisins, tels que le *V. Metchnikowi*, par un certain nombre de savants. Le caractère particulier des miennes est que je me suis surtout attaché à mettre en

1. J. BORDET. Ces *Annales*, juin 1895 et avril 1896.

2. METCHNIKOFF. Ces *Annales*, juin 1895.



lumière les phénomènes qui précèdent l'englobement des microbes par les leucocytes, puisque, pour MM. Pfeiffer, Gruber et Durham, ce sont ces phénomènes-là qui importent.

Le vibron qui m'a servi est le *V. Massaoua*. Dans le péritoine, il tue un cobaye de 400 à 500 grammes, à une dose d'environ  $1/8$  d'une culture sur gélose nutritive âgée de 18 à 24 heures. Ce vibron tue aussi le cobaye par injection sous-cutanée. J'ai bien réussi à tuer quelques gros cobayes, mais les résultats obtenus n'étaient pas constants. Au contraire, les jeunes cobayes de moins de 150 grammes mouraient à coup sûr par l'injection d'une dose variant de  $1/3$  à  $1/2$  culture.

Mon cher maître, M. Metchnikoff, m'a dirigé dans ces recherches, et ses excellents conseils m'ont été d'un grand secours. Qu'il reçoive ici l'expression de ma très vive reconnaissance.

### I. — *Immunité passive.*

A. CHEZ LES JEUNES COBAYES. — Je préparais les cobayes en leur inoculant, 15 à 18 heures avant l'introduction du vibron, 1 c. c. de sérum actif. L'inoculation était faite, en général, sous la peau du dos (c'est-à-dire en un point assez éloigné de celui par où devaient être introduits les vibrions); quelquefois aussi dans le péritoine, parfois même sous la peau du ventre, au même point que le choléra. Le sérum antimicrobien employé provenait de cobayes vaccinés contre le *Massaoua* par des inoculations intrapéritonéales de vibrions vivants. Son activité était telle que 1 centigramme, souvent même  $1/4$  de centigramme, protégeait un cobaye de 400 à 500 grammes, contre une dose mortelle intra-abdominale de vibrions. Naturellement, ce sérum possédait, vis-à-vis du *V. Massaoua*, un pouvoir agglutinant très actif et très rapide.

Les cultures de choléra sur gélose nutritive étaient diluées dans la solution physiologique de sel marin; je m'arrangeais de façon à ce que chaque cobaye reçût 1 c. c. de dilution.

Les cobayes témoins mouraient en moins de 24 heures. Dans l'œdème formé, les vibrions restaient isolés et mobiles en grande partie; il y a un commencement de phagocytose.

L'animal succombe avec généralisation du vibron dans tous

les organes. Le sang du cœur, ensemencé sur gélose, donne toujours une abondante culture.

Dans le cas général, qui est en même temps le cas moyen <sup>1</sup>, on observe chez le cobaye traité la formation d'un œdème au point d'inoculation. Cet œdème ne contient d'abord que du liquide fibrineux et quelquefois des globules rouges. Il y a dilution des microbes dans ce liquide. Ils restent isolés. Une partie demeure mobile, mais la majorité s'immobilise peu à peu. Jamais on n'observe de phénomène de Pfeiffer. Les microbes immobilisés se colorent bien et ont conservé tout leur pouvoir de multiplication; une goutte pendante, mise à l'étuve ou laissée dans le laboratoire à 20°, se peuple de vibrions très mobiles; 6 à 8 heures après l'inoculation, les leucocytes font leur apparition et englobent aussitôt des vibrions,

A leur intérieur, on voit la majorité des microbes ayant conservé la forme vibrionienne et d'autres en boules. A partir de ce moment, la phagocytose se fait peu à peu; 24 heures après l'inoculation, il existe encore quelques microbes libres, isolés, mobiles ou immobiles; — 48 heures après, ils ont tous disparu. Néanmoins, on obtient d'abondantes cultures en goutte pendante avec l'exsudat pris 2 et même 3 jours après l'inoculation<sup>2</sup>, et on a encore des colonies sur gélose 6 ou 8 jours après l'inoculation.

J'ai répété un grand nombre de fois l'expérience et j'ai obtenu des résultats la plupart du temps tout à fait semblables, quelquefois légèrement différents.

J'ai ainsi noté que, dans quelques cas, la mobilité des microbes, dans les 40 premières heures, était *aussi grande* chez le témoin que chez le vacciné <sup>3</sup>; — d'autres fois, chez les cobayes en expérience, témoin et traité, il y avait une diminution notable de la mobilité. Très fréquemment, l'exsudat sous-cutané des témoins morts, lors même qu'il était retiré au moment de la mort, montrait des vibrions parfaitement isolés, mais en grande majorité immobiles.

1. Voir l'expérience I de l'appendice.

2. Chez certains cobayes, j'ai observé, avec la plus grande netteté, ce développement intracellulaire des bactéries englobées. Certaines cellules avaient triplé de volume, et on voyait leur contenu composé uniquement de vibrions très serrés,

3. J'ai pu suivre, chez certains de ces microbes, toutes les phases de la division transversale : allongement, forme en S, puis rupture.



Dans un cas, chez un cobaye traité, il y avait non-seulement immobilisation des microbes, mais encore un commencement d'amoncellement; cette réunion des microbes en amas était, à la vérité, bien incomplète, et nullement comparable à celle que l'on observe *in vitro*. Je suppose que, dans cette expérience, une petite quantité du sérum, injecté la veille, avait pu agir directement sur les microbes. Mais je n'ai pu la reproduire. D'ailleurs, cet amoncellement des microbes n'a pas persisté et le cobaye a réagi exactement comme les autres traités. — Il m'a semblé que chez les cobayes préparés par injection *intra-abdominale* de sérum, les microbes conservaient mieux leur mobilité, et que la réaction phagocytaire commençait plus tôt.

Certains faits se dégagent de cette étude :

1° A aucun moment, il n'apparaît de phénomène de Pfeiffer sous la peau; les boules sont même rares dans les leucocytes. Il est certain que les microbes sont englobés à l'état de vibrions et que généralement ils dégénèrent dans les cellules en conservant leur forme vibrionienne;

2° Le cobaye traité et le témoin présentent les mêmes phénomènes dans les premières heures qui suivent l'inoculation. Tout au plus peut-on noter une immobilité relative des microbes chez le vacciné. Mais il est impossible d'attacher de l'importance à ce phénomène d'immobilisation des microbes, puisqu'il se produit également, quoique plus rarement, chez les témoins, et que chez les vaccinés il ne se présente pas avec une grande constance;

3° A moins d'action directe du sérum injecté sur les microbes, on n'observe jamais d'amas sous la peau, rien qui rappelle ce phénomène de l'amoncellement si net dans les réactions *in vitro*.

Pourtant, l'exsudat paraît bien être quelquefois capable de produire le phénomène, car des gouttes pendantes, ne renfermant que des microbes libres isolés, donnent des cultures en amas;

4° Les microbes libres et immobiles ne paraissent nullement affectés dans leur faculté de croissance. Quelques heures à 35° ou un plus long séjour à 20° donnent un abondant développement dans les gouttes pendantes;

5° Il est incontestable que les microbes englobés le sont à l'état vivant. Les gouttes pendantes contenant des phagocytes donnent, à 35°, des cultures très abondantes, d'énormes colonies

formées de microbes pressés les uns contre les autres;

6° Enfin notons que les microbes, après leur englobement, peuvent encore vivre longtemps. Alors que l'englobement est complet 2 jours après l'inoculation, il y a encore des microbes vivants au bout de 8 jours.

En résumé, *pour expliquer l'immunité conférée par le sérum actif aux jeunes cobayes inoculés sous la peau, il semble difficile de faire intervenir une action directe du sérum sur les microbes. On est amené à expliquer leur immunité par une action plus énergique des leucocytes.*

B. COBAYES ADULTES. — J'ai fait un certain nombre d'expériences d'immunité passive avec des cobayes de 300 à 500 grammes, préparés 24 heures auparavant avec 0,75 c.c. ou 1 c.c. de sérum, et auxquels j'inoculais des doses variant de 1/3 de culture à une culture. *J'ai observé les mêmes phénomènes que chez les jeunes cobayes.* Mais, dans ces expériences, une partie seulement des témoins mouraient; la dose de vibrions inoculés n'était pas sûrement mortelle. J'examinerai dans un autre paragraphe comment se comportaient les cobayes qui survivaient.

Les résultats de quelques expériences, faites dans des conditions spéciales, sont intéressants à noter.

Dans un cas, j'ai inoculé le sérum 3 minutes seulement avant les vibrions, et en un point assez voisin. J'ai pourtant observé les phénomènes précédemment décrits.

Dans d'autres cas, je faisais *in vitro* un mélange de vibrions cholériques avec 1/2 c. c. de sérum actif, et je l'inoculais aussitôt. Le sérum produisait naturellement un amoncellement très net et très accusé des vibrions <sup>1</sup>.

Il semble qu'en se plaçant dans ces conditions très favorables pour l'action directe du sérum sur les microbes, on doive diminuer fortement l'intervention phagocytaire. Au contraire, cette action paraît plus rapide que dans les premières expériences relatées. La présence du sérum au point d'inoculation semble attirer les leucocytes, et cette manière de voir paraîtra fort vraisemblable si j'ajoute que, au point d'inoculation du sérum seul sous la peau, on trouve le lendemain beaucoup de leucocytes.

Quand les leucocytes sont arrivés au point d'inoculation, il semble que les conditions soient très favorables pour la mani-

1. Voir l'expérience II de l'Appendice.



festation du phénomène de Pfeiffer. Or les boules extra-cellulaires sont aussi rares que dans les cultures injectées. Au contraire, dans les leucocytes, elles sont beaucoup plus nombreuses que les formes vibrioniennes.

Ce phénomène de Pfeiffer, qui ne se produit pas sous la peau, se manifeste avec la plus grande netteté dans une goutte pendante retirée de l'œdème 2 heures 1/2 après l'inoculation, et qui contient quelques leucocytes. C'est une confirmation très nette des vues de M. Metchnikoff sur ce phénomène.

Dans l'exsudat retiré 7 heures après l'inoculation, le nombre des vibrions isolés, faible dans les premières heures, a augmenté notablement. On peut penser qu'il y a là l'indice d'une adaptation du microbe au milieu de l'exsudat.

Enfin remarquons que les vibrions en amas se développent bien, ne semblent pas gravement atteints dans leur vitalité.

J'ai d'ailleurs noté, dans une expérience, que les vibrions englobés par les leucocytes étaient doués d'une grande vitalité. Dans une goutte pendante où il n'existait pas de vibrions libres (vérification par une préparation colorée), après 20 heures à 35°, on avait de nombreux amas de microbes, et entre eux des vibrions libres et isolés.

C. JEUNES LAPINS. — A propos de ces expériences d'immunité passive, je dois encore signaler que j'ai expérimenté aussi sur de jeunes lapins de 300 grammes. J'ai noté la même mobilité des microbes chez le témoin et le lapin traité.

Je puis donc généraliser la notion qui découle si nettement des expériences sur les cobayes de 100 grammes et déclarer que :

*Dans l'immunité passive, quelle que soit la manière dont cette immunité est conférée, les animaux traités résistent par le processus phagocytaire ; c'est là leur mode de résistance essentiel, tout à fait prépondérant.*

*L'analyse des phénomènes empêche d'accorder un rôle dans l'immunité à l'immobilisation, à l'amoncellement et à la transformation en boules des microbes.*

## II. — Immunité active.

Je crois devoir diviser les expériences en deux catégories, suivant qu'elles ont porté sur des animaux faiblement immunisés (capables de résister à la dose minima mortelle intra-abdo-

minale); dont le sérum a un faible pouvoir agglutinant, — ou sur les cobayes solidement immunisés, dont le sérum a un pouvoir préventif tel que 1 centigramme et quelquefois même 1/4 de centigramme suffisent à protéger un cobaye de 400 à 500 grammes.

La description minutieuse que j'ai faite de la marche de la maladie dans l'immunité passive me permet d'être très bref.

Quand il s'agit de cobayes ayant une faible immunité, les phénomènes que j'ai notés avec soin chez les jeunes cobayes traités par le sérum se présentent. Les microbes demeurent isolés; on ne constate jamais même cet amoncellement faible que le sérum de ces cobayes est capable de produire *in vitro*. La mobilité diminue tantôt comme chez le témoin, tantôt plus fortement; mais il n'y a jamais immobilité complète.

Chez les cobayes bien vaccinés, on constate une formation d'amas microbiens dans l'œdème, surtout dans les premières heures qui suivent l'inoculation. Mais il n'y a là rien de comparable, surtout comme intensité, aux phénomènes qui se passent *in vitro*: l'amoncellement est toujours incomplet; il reste une proportion assez forte de microbes isolés, voire mobiles; les amas sont souvent mal délimités, petits; quelquefois ils persistent dans les préparations colorées; d'autres fois, l'étalement de la goutte suffit à détruire les amas.

Quelques heures après l'inoculation, le nombre des amas diminue; les microbes isolés deviennent plus nombreux en proportion des agglomérés, et aussi en quantité absolue. Il semble donc qu'il y ait adaptation du microbe au milieu où il se trouve.

Si on retire une goutte d'exsudat un petit nombre d'heures, deux par exemple, après l'inoculation, on constate que dans cette goutte *in vitro*, il y a d'abord augmentation notable du nombre et de la grosseur des amas; ce n'est que plus tard que le nombre des vibrions isolés et mobiles augmente.

*Des phagocytes entrent très tôt en action*; ils englobent les microbes à l'état de vibrions (il n'y a jamais de boules extracellulaires), et une partie de ces vibrions se transforment bientôt en boules dans les cellules. 24 heures après le commencement de l'expérience, quelquefois même plus tôt, l'englobement est complet; 48 heures après, généralement tous les microbes sont détruits.



*Dans les cas d'immunité active, on est encore obligé de reconnaître que le principal rôle est dévolu aux phagocytes qui exercent leur double pouvoir d'englober et de détruire les microbes plus rapidement que dans les cas d'immunité passive.*

Que le faible amoncellement des microbes qu'on observe dans l'exsudat des animaux bien vaccinés, aide à leur destruction, cela est possible; mais la part qui revient à cette action directe des humeurs sur les vibrions, dans le mécanisme de l'immunité, est incontestablement bien faible vis-à-vis de la part de la phagocytose.

### III. — *Immunité naturelle. — Immunité artificielle non spécifique.*

S'il existe une explication générale de l'immunité des animaux réfractaires à la septicémie vibrionienne, elle doit s'appliquer aux cas où on ne leur a pas conféré une immunité spécifique.

Il est donc intéressant de voir ce qui se passe chez un animal qui résiste naturellement à l'introduction du vibron.

Un certain nombre des cobayes adultes que j'employais comme témoins dans mes expériences d'immunité active ou passive ont résisté.

Ceux qui succombent meurent avec vibrions généralisés dans tous les organes. C'est une maladie identique à celle provoquée par l'injection intra-abdominale. Les vibrions libres sous la peau et dans la cavité abdominale sont nombreux. Dans le sang, il ne m'est pas arrivé de déceler leur présence à l'examen microscopique, mais l'ensemencement donne toujours un gazon uniforme de choléra.

Si la mort est rapide, la réaction phagocytaire est nulle ou à peu près. Si la mort a lieu en 20 heures et plus, les phagocytes renfermant des microbes sont assez nombreux sous la peau et dans le péritoine.

On a tous les degrés entre une réaction nulle de la part des phagocytes et une réaction très notable, quoique insuffisante pour protéger l'animal.

Mais cette réaction peut aussi être suffisante; alors l'animal survit et il y a une destruction complète des microbes à l'in-

térieur des leucocytes. Pourtant il n'y a eu aucune action directe des humeurs sur les vibrions ; là il est impossible de nier que la destruction ne soit due uniquement à une action phagocytaire.

Notons que l'englobement et la destruction des vibrions se font moins vite que chez les animaux ayant l'immunité spécifique ; cela est surtout net quand on compare la marche de la réaction chez un cobaye immun activement et chez son témoin.

Chez la poule qui a l'immunité naturelle contre le vibron cholérique, chez la tortue et chez la grenouille à qui on inocule des doses non mortelles, je n'ai jamais constaté de phénomène d'amoncellement. La destruction des microbes a lieu nettement par le processus phagocytaire.

Mes essais d'immunisation par des cultures stérilisées de bacille rouge de Kiel et de *M. Prodigiosus* ont été peu heureux ; les jeunes cobayes sont extrêmement sensibles aux toxines de ces microbes.

Chez un cobaye de 165 grammes qui avait reçu, 18 heures avant l'inoculation du *Massaoua*, 1/6 de culture de Kiel de 2 jours stérilisée à 74°, j'ai noté, 6 heures après l'inoculation, que la mobilité des vibrions avait simplement diminué et, 24 heures après, que les rares vibrions libres étaient tous isolés et parfaitement mobiles (ils ont donné d'ailleurs une abondante culture de vibrions extrêmement mobiles).

Je ne suis pas arrivé à préserver d'une façon certaine les jeunes cobayes en leur inoculant à l'avance du bouillon ordinaire de culture. Souvent, j'avais une survie très nette (le témoin mourait en 18-20 heures, le traité en 48) ; un cobaye qui avait reçu la veille 2 c. c. de bouillon très frais dans le péritoine a résisté à une dose mortelle de vibrions sous la peau ; d'autres qui avaient reçu jusqu'à 3 inoculations de bouillon, à un jour d'intervalle, ont également résisté.

Chez tous ces cobayes traités par le bouillon, quel que soit le résultat final, j'ai observé soit une grande mobilité des microbes injectés, soit une immobilité partielle, mais jamais d'amas.

Un cobaye qui avait reçu 3 injections de bouillon sous la peau du ventre, et où il s'était formé un œdème avec beaucoup de globules blancs, a montré une réaction phagocytaire très rapide et très intense : l'englobement était complet 8 heures après l'inoculation.



J'ai eu un résultat semblable chez un cobaye qui avait reçu sous la peau du flanc 1 c. c. de sérum actif, un peu contaminé. Dans les deux cas, au moment de l'introduction des vibrions, il y avait déjà de nombreux leucocytes au point d'inoculation. Le 1<sup>er</sup> stade de la réaction leucocytaire était donc supprimé. Dans ces œdèmes préformés, il ne s'est pas produit trace de phénomène de Pfeiffer.

Les expériences exposées dans ce paragraphe nous montrent avec la plus grande netteté que, dans les cas d'immunité non spécifique, la réaction de l'organisme est étroitement liée au pouvoir phagocytaire.

#### IV. — *Expériences dans la chambre antérieure de l'œil.*

J'ai expérimenté sur de jeunes et de gros lapins à qui j'inoculais une émulsion très dense de vibrions dans la chambre antérieure de l'œil. Certains de ces lapins avaient reçu, la veille de l'inoculation, 3/4 ou 1 c. c. de sérum actif sous la peau; les autres étaient des lapins neufs.

Quoique je n'aie pas réussi à tuer les témoins, les faits observés offrent quelque intérêt.

Quand l'inoculation est bien réussie, la destruction des microbes dure toujours plus longtemps que sous la peau. Les leucocytes apparaissent plus tard et pendant longtemps sont en nombre assez restreint.

Le premier jour, il se présente quelquefois dans la chambre antérieure une immobilisation plus ou moins complète des microbes, voire un amoncellement partiel... Mais ces changements sont peu profonds (quelques heures à 35° dissocient partiellement les amas dans les gouttes pendantes, et donnent de nombreux microbes mobiles) et assez fugaces. Le 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> jour, les microbes redeviennent isolés et assez mobiles, et c'est à cet état qu'ils sont englobés.

Une expérience faite dans des conditions un peu particulières me paraît digne d'appeler l'attention.

Il s'agit d'un jeune lapin de 365 grammes à qui j'avais inoculé, dans la chambre antérieure, une émulsion de vibrions dans du sérum actif.

2 heures 1/2 après l'inoculation, une goutte pendante montre de nombreux amas, très gros, et entre eux quelques rares vibrions isolés et mobiles. Cette goutte, à 35°, donne le lendemain une belle culture; on a toujours des amas, mais moins séparés, et un grand nombre de microbes libres, très mobiles.

4 heures 1/2 après l'inoculation, on observe encore des amas, mais moins gros que précédemment; le nombre des microbes libres, en revanche, a augmenté. Quelques rares leucocytes sont déjà présents; mais la phagocytose ne paraît pas avoir commencé. — La goutte pendante, à 35°, montre le lendemain une belle culture; les microbes isolés, très mobiles, sont nombreux.

10 heures après l'inoculation, des préparations colorées montrent que la phagocytose a commencé; un certain nombre de leucocytes sont bourrées de microbes, de forme vibrionienne. Tous les microbes englobés se colorent bien. Ils proviennent évidemment de microbes isolés, car ils sont les seuls qui se colorent bien. A côté des leucocytes, on voit de nombreux petits amas de microbes prenant mal la couleur, boursoufflés; il s'agit probablement de microbes tués par le sérum bactéricide qui, dans le milieu très restreint de la chambre antérieure de l'œil, a eu le temps d'agir avant l'arrivée des humeurs et des leucocytes.

Ici nous voyons avec la plus grande netteté que les leucocytes englobent de préférence des microbes vivants, délaissant les microbes morts.

J'ai d'ailleurs pu constater directement que les leucocytes étaient faiblement attirés par les microbes morts, en injectant sous la peau d'un cobaye des microbes tués par un séjour de 1 heure à 74°; l'arrivée des leucocytes a été très tardive.

Cette observation corrobore pleinement celle déjà ancienne de M. Lubarsh<sup>1</sup> qui a vu, en injectant des bactériidies charbonneuses par la veine abdominale d'une grenouille, que l'englobement était beaucoup plus rapide quand les bacilles étaient vivants que quand ils étaient morts.

Le lendemain et le surlendemain de l'inoculation, on avait un grand nombre de microbes isolés et mobiles; le nombre est resté à peu près le même durant ces 2 jours. On se rend faci-

1. LUBARSH. *Fortschr. d. Med.*, 6, 1888, p. 424-430.



lement compte qu'il y a eut, d'une part, culture des vibrions dans la chambre antérieure, et d'autre part, englobement d'un certain nombre de microbes par les phagocytes.

Ce n'est que 3 jours après l'inoculation que la phagocytose est complète.

En résumé, dans les expériences dans la chambre antérieure de l'œil, il y a un retard dans la destruction des microbes; on peut ainsi apercevoir nettement une adaptation du vibron aux humeurs de l'organisme inoculé. L'immobilisation et l'agglutination qui ont pu se produire au commencement de l'expérience disparaissent; et l'organisme a à lutter contre des microbes jouissant de leur mobilité et de toutes leurs propriétés vitales. C'est à ce moment que les leucocytes entrent en jeu.

Dans les expériences sous la peau, j'ai déjà noté une semblable adaptation des vibrions, mais la phagocytose, commençant très tôt, empêche de bien saisir la suite des phénomènes.

Ces constatations m'autorisent, ce me semble, à affirmer avec plus d'autorité que l'action directe que les humeurs peuvent exercer sur les microbes, se traduisant parfois par l'immobilisation, parfois même par un amoncellement, d'ailleurs toujours partiel, ne joue pas un rôle essentiel dans la résistance de l'organisme au microbe envahisseur. Cette action complique simplement l'interprétation des phénomènes.

#### V. — *Caractères de l'immunité vibrionienne.*

L'étude complète et attentive des différents cas d'immunité contre la septicémie vibrionienne montre, avec la plus grande netteté, qu'un seul et unique processus intervient dans tous ces cas: c'est le processus phagocytaire. Les leucocytes, plus ou moins tôt suivant les cas, arrivent sur le champ de bataille et débarrassent l'organisme de ses envahisseurs.

A la suite des inoculations sous-cutanées ou intra-oculaires, les microbes extra cellulaires conservent toujours leur forme vibrionienne. *Je n'ai jamais observé, dans ces conditions, de phénomène de Pfeiffer.*

L'immobilisation et l'agglutination des microbes ne se présentent que dans des cas restreints; ces phénomènes ne se manifestent avec aucune régularité. Il est donc impossible de

supposer qu'ils sont de quelque importance pour la résistance de l'animal. D'ailleurs, les microbes immobilisés ou en amas conservent leur faculté de multiplication et donnent d'abondantes cultures soit en goutte pendante, dans l'exsudat du cobaye, soit sur gélose nutritive.

La réaction leucocytaire commence au bout d'un temps variable. Elle marche surtout vite chez les cobayes ayant une forte immunité active, moins vite chez les cobayes ayant seulement l'immunité passive, et enfin encore plus lentement chez les cobayes ayant l'immunité naturelle.

Les microbes sont englobés vivants et avec leur forme vibronienne. Dans l'intérieur des leucocytes, une partie de ces vibrions se transforment en boules tout à fait semblables aux boules extracellulaires de Pfeiffer. J'ai remarqué que ce phénomène se produisait avec d'autant plus de fréquence que la phagocytose commençait plus tôt après l'inoculation des microbes.

Ainsi, chez des cobayes bien vaccinés, la grande majorité des microbes englobés était en boules. En revanche, chez les lapins inoculés dans la chambre antérieure de l'œil, les boules étaient très rares. Il y a là sans doute une question d'adaptation du microbe aux humeurs de l'animal.

Alors que la phagocytose est complète, on obtient encore d'abondantes cultures en mettant à 35° des gouttes pendantes faites avec l'exsudat; et si l'on a soin de ne pas laisser la goutte pendante trop longtemps à 35°, on constate un abondant développement dans les leucocytes qui, plus tard, trop gonflés, éclatent et donnent un gros amas de vibrions. Les cultures sur gélose réussissent encore plus longtemps et j'ai noté que, chez de jeunes cobayes, il se faisait au point d'inoculation une sorte d'abcès où quelques vibrions pouvaient résister à l'influence bactéricide du protoplasme cellulaire jusqu'au 7<sup>e</sup> ou 8<sup>e</sup> jour après l'inoculation. C'est là un fait analogue à celui observé par M. Metchnikoff<sup>1</sup> avec le hog-choléra.

Comment devons-nous concevoir le rôle du sérum chez les vaccinés?

Nous avons éliminé l'influence directe des humeurs, plus ou moins chargées de substance immunisante, sur les microbes. Nous pensons que l'action, importante pour la résistance de

1. METCHNIKOFF, Ces *Annales*, mai 1892.



l'animal, est surtout celle qui porte sur le système phagocytaire.

Il y a tous les degrés possibles entre la résistance d'un cobaye succombant à la septicémie vibrionienne, celle d'un cobaye ayant l'immunité naturelle, et celle d'un autre à qui on a conféré artificiellement l'immunité.

Si la dose inoculée à un cobaye neuf est énorme, il succombe en un petit nombre d'heures sans la moindre réaction phagocytaire. Si la maladie dure 20 à 24 heures, les phagocytes interviennent nettement; mais leur intervention est insuffisante pour protéger l'animal. Un cobaye neuf qui survit ne diffère du précédent qu'en ce que les phagocytes, ayant affaire à un moins grand nombre de microbes, réussissent à venir à bout de tous leurs ennemis, ou bien en ce que la défense s'accomplit avec plus d'énergie.

S'il s'agit d'un animal immunisé activement ou passivement, les phénomènes semblent indiquer que les phagocytes ont acquis une plus grande énergie pour la lutte contre les microbes. La comparaison entre un cobaye bien vacciné et un animal neuf de même poids qui résiste plaide en faveur de cette manière de voir.

J'arrive ainsi à la notion d'une *excitation cellulaire*, déjà mise en avant par M. Metchnikoff<sup>1</sup> en 1892, développée par M. Roux<sup>2</sup> au congrès de Buda-Pesth en 1894, et qui depuis a été acceptée par certains, critiquée par beaucoup.

Mes expériences ne me permettent pas de me prononcer nettement sur le point de savoir s'il y a attraction plus forte et plus rapide des leucocytes (certains faits observés chez des cobayes immunisés activement sont en faveur de cette manière de voir, mais je n'ai pu en constater la généralité); — ou bien si l'englobement se fait plus facilement; — ou enfin si les leucocytes des animaux immunisés ont un protoplasma plus énergiquement bactéricide par le fait même de leur immunisation. — Les faits très intéressants observés *in vitro* par M. J. Bordet plaident, il me semble, en faveur de cette dernière manière de voir.

Paris, 28 juin 1896.

1. METCHNIKOFF. Ces *Annales*, mai 1892.

2. ROUX. Ces *Annales*, octobre 1894.

## APPENDICE

*Détail d'expériences d'immunité passive sous la peau.*

« L'expérience I porte sur un cobaye préparé la veille de l'inoculation ; l'expérience II, sur un cobaye qui a reçu un mélange de vibrions et de sérum.

**EXPÉRIENCE I.** — Le 7 mai, à 4 heures du soir, un cobaye de 100 grammes reçoit sous la peau du flanc droit 1 c. c. de sérum.

Le 8 mai, à 10 heures du matin, ce cobaye et un autre de la même portée reçoivent  $\frac{1}{3}$  d'une culture sur gélose de 18 heures.

A 11 heures  $\frac{3}{4}$  (soit 1 heure  $\frac{3}{4}$  après l'inoculation), les 2 cobayes ont un œdème déjà bien marqué. Les gouttes pendantes, faites avec l'exsudat retiré de l'œdème, montrent chez les deux des microbes très nombreux, parfaitement isolés et mobiles.

A 4 heures  $\frac{1}{2}$  (soit 6 heures  $\frac{1}{2}$  après l'inoculation), l'œdème a beaucoup augmenté chez les deux cobayes ; il est un peu plus gros chez le cobaye qui a reçu du sérum.

Chez le *cobaye traité*, on retire un exsudat faiblement rosé contenant des globules rouges, quelques rares globules blancs (leucocytes polynucléaires) et beaucoup de microbes (il y en a beaucoup moins que dans la prise précédente). Tous ces microbes sont isolés, il y en a de mobiles, mais la majorité sont immobiles. Une préparation, colorée au bleu de méthylène, montre les microbes libres prenant fortement la couleur bleue, ayant tous conservé la forme vibrionienne ; *on ne rencontre pas une seule boule extracellulaire*. Les rares leucocytes de la préparation sont bourrés de microbes, se colorant encore bien et ayant généralement conservé leur forme ; néanmoins, il existe un certain nombre de microbes en boules dans les cellules...

Après une nuit passée à 20°, la goutte pendante faite avec l'exsudat de ce cobaye montre une culture abondante ; la mobilité a beaucoup augmenté ; il y a aussi une culture très nette de microbes dans les leucocytes.

Chez le *témoin*, le tableau est sensiblement le même que chez le cobaye traité, avec cette différence que la grande majorité des microbes paraît mobile.

A partir de ce moment, la maladie évolue différemment chez les deux cobayes. Le *témoin* succombe dans la nuit avec généralisation du vibrion cholérique. L'exsudat péritonéal (très peu abondant) et le sang du cœur donnent, sur gélose, un gazon uniforme de Massaua.

Le 9 mai, à 11 heures du matin (soit 25 heures après l'inoculation) je retire de l'œdème du cobaye traité un exsudat clair, rosé, avec glo-



bules rouges, globules blancs assez nombreux, microbes libres paraissant à peu près tous immobiles (on arrive difficilement à en voir 1 ou 2 de mobiles).

Une préparation colorée révèle la présence de microbes libres, isolés, encore assez nombreux, ayant tous gardé la forme vibrionienne, et se colorant bien. Parmi les leucocytes, il y en a beaucoup qui sont bourrés de microbes, la plupart en vibrions, quelques-uns en boules peunettes.

Les microbes de la goutte pendante ont gardé un grand pouvoir de multiplication, car un séjour de 4 heures à 35° donne un développement très abondant; la grande majorité des microbes est mobile; on n'observe pas d'amas.

Le 9 mai, dans la soirée, le tableau reste le même.

Le 10 mai, à 11 heures du matin, l'œdème a diminué, est devenu plus dur. J'en retire une goutte d'exsudat assez clair; elle contient une grande majorité de globules blancs et, en goutte pendante, je ne distingue pas un seul microbe libre. Une préparation colorée montre de très rares microbes libres, mais ils peuvent fort bien provenir de globules éclatés, assez communs dans la préparation. On voit encore beaucoup de leucocytes contenant à leur intérieur des microbes; mais ces microbes commencent à dégénérer; néanmoins on voit peu de boules. Un ensemencement sur gélose donne un gazon presque uniforme de choléra. La goutte pendante, mise à l'étuve, donne le lendemain d'abondantes colonies provenant évidemment de microbes intracellulaires, avec amas mal limités; tous les microbes sont immobiles. Les amas sont peu consistants, car l'étalement de la goutte sur une lamelle suffit à les dissocier; et une préparation colorée montre des vibrions se colorant bien et nettement séparés.

Le 11 mai, à 3 heures du soir (*soit 77 heures après l'inoculation*), l'exsudat est trouble à cause du nombre de globules blancs. La phagocytose paraît presque terminée; on ne trouve, dans une préparation colorée, que de rares cellules contenant quelques microbes se colorant mal. L'ensemencement donne de nombreuses colonies se touchant. Une goutte pendante, laissée 20 heures à l'étuve, montre de nombreuses colonies rondes, de grosseur tout à fait variable, bien compactes.

Le 12 et 13 mai, l'ensemencement de l'exsudat donne de nombreuses colonies. Le 14 et le 16 mai (*soit 6 et 8 jours après l'inoculation*), j'obtiens encore une dizaine de colonies en ensemençant sur gélose une goutte d'exsudat. Enfin, le 18 mai, l'ensemencement est négatif.

*Expérience II.* — Le 24 mars, un cobaye de 260 grammes reçoit

sous la peau du ventre un mélange de 1 c. c. d'émulsion de vibrions, (soit 1/3 de culture) et de 1/2 c. c. de sérum.

3/4 d'heure après l'inoculation, l'œdème est déjà bien développé. Les microbes sont presque tous réunis en amas; il n'existe que de rares vibrions mobiles. Le lendemain, dans la goutte pendante placée à 35°, les amas ont augmenté, se sont plus ou moins enchevêtrés; mais ce sont toujours des amas de microbes immobiles; entre eux, sur les bords, on voit des microbes parfaitement mobiles.

Entre 1 heure et 2 heures après l'injection, l'œdème augmente notablement.

2 heures 1/2 après l'inoculation, il contient toujours des amas; entre eux, quelques rares vibrions mobiles. Les leucocytes sont encore peu nombreux. Une préparation colorée montre que les amas sont formés de vibrions normaux et que les boules y sont tout à fait exceptionnelles. Les leucocytes ont commencé à englober les microbes; et à côté de microbes intracellulaires de forme vibronienne, il existe de très nombreuses boules.

La goutte pendante, laissée deux heures à l'étuve, montre beaucoup de vibrions libres redevenus mobiles, et aussi un grand nombre transformés en boules; il y a eu, *in vitro*, phénomène de Pfeiffer très net. En maintenant la goutte 24 heures à 35°, il reste encore des amas; mais il n'y a plus de boules; on voit de nombreux microbes mobiles et une culture très nette dans les leucocytes.

7 heures après l'inoculation, on trouve toujours des amas, mais moins nombreux. Entre eux, beaucoup de microbes isolés, bien plus que dans les prises précédentes. Les leucocytes sont très nombreux; la phagocytose est déjà très intense. A l'intérieur des leucocytes, il y a surtout des boules et quelques vibrions.

24 heures après l'inoculation, la phagocytose est complète.

---



## CONTRIBUTION

### A L'ÉTUDE DES ASSOCIATIONS BACTÉRIENNES DANS LA DIPHTÉRIE

PAR MM. LES D<sup>ES</sup> L. DE BLASI ET G. RUSSO-TRAVALI

---

I. — L'importance des associations bactériennes dans la diphtérie a été originairement signalée par MM. Roux et Yersin, qui ont vu l'infection diphtérique s'aggraver par l'association du streptocoque. Von Schreider a vu ensuite que les toxalbumoses précipitées par l'alcool d'une culture mélangée du bacille de Löffler et du streptocoque de Fehleisen étaient plus virulentes que celles d'une culture du bacille seul. Myer a trouvé que l'infection amenée chez le cobaye par le bacille diphtérique seul est moins grave que celle que provoque l'injection simultanée de bacille diphtérique et de streptocoque. Il a observé aussi, en collaboration avec M. le Dr Giarre, que le cobaye adulte, ordinairement réfractaire à l'infection pneumococcique, périt d'une septicémie si on l'infecte simultanément avec une culture diphtérique et des matières pneumococciques.

Barbier d'abord, et Martin ensuite, ont séparé les angines diphtériques accompagnées par le streptocoque de celles qu'accompagne le staphylocoque.

Plus récemment Bernheim, étudiant au moyen des cultures les membranes diphtériques, a trouvé un streptocoque court et un long, trois variétés de staphylocoques, et un bacille pseudo-diphtérique, différant du bacille de Löffler par ses caractères de culture et son défaut de virulence. En comparant les résultats bactériologiques et cliniques pour ces affections mixtes, il a conclu qu'il n'y avait aucune relation entre l'association bactérienne et l'intensité de l'infection, ayant trouvé les mêmes êtres dans des cas très graves et très légers <sup>1</sup>.

Etudiant ensuite la symbiose entre le bacille de Löffler et ses associés dans les membranes diphtériques, il a vu que, dans

1. *Zeitschr. f. Hyg.*, t. XVIII, fasc. 3, 1894.

le bouillon, il y a antagonisme entre ce bacille et les streptocoques, mais non avec le staphylocoque. Traitant ensuite les cobayes avec des cultures, filtrées ou non, de streptocoques et de staphylocoques, et injectant ensuite tantôt simultanément, tantôt après un certain temps des bacilles diphtériques, il a vu que l'infection mixte avec le streptocoque est bien plus grave qu'avec le streptocoque ou le bacille seul. Enfin Bernheim a vu que le bacille de Löffler se développe vigoureusement et augmente de virulence quand on l'ensemence dans des cultures filtrées de streptocoques ou de staphylocoques.

En même temps qu'il établissait les caractères définitifs de la diphtérie, Bretonneau admettait l'existence de laryngites pseudo-membraneuses indépendantes de cette maladie. Dans son excellent travail sur l'étiologie de la diphtérie, Löffler fait des réserves sur la spécificité du bacille, et les fonde en partie sur ce qu'il ne l'a pas rencontré dans tous les cas diagnostiqués comme diphtériques. Wurtz et Bourges ont fait voir qu'il y a, dans la scarlatine, des angines pseudo-membraneuses dues, non au bacille de Löffler, mais à un streptocoque analogue à celui de la suppuration.

MM. Roux et Yersin, Martin, Ménétrier, Morel, Netter, Bourges, Baginski, Loir, Ducloux, Veillon, etc., ont mis hors de doute l'existence d'angines pseudo-membraneuses, non scarlatineuses et non diphtériques, et dues pour la plus grande partie au streptocoque pyogène, moins fréquemment au pneumocoque, et plus rarement encore au staphylocoque (Veillon). Dans un cas signalé par Boulloche<sup>1</sup>, le streptocoque était associé au *B. coli commune*. Dans un autre cas de Teissier<sup>2</sup>, on n'a trouvé qu'à l'*Oidum albicans* dans l'exsudat d'une angine diphtérique chez un syphilitique.

II. — Le but de cette courte communication est de rapporter les résultats obtenus dans l'examen bactérioscopique de 234 pseudo-membranes, qui nous ont fourni l'occasion d'étudier cliniquement et expérimentalement l'association du bacille de Löffler avec le colibacille, association qui, à notre connaissance, n'avait pas encore été constatée.

1. Les angines à fausses membranes, *Bibl. Charcot-Debove*.

2. *Arch. de méd. exp.*, mars 1895.



A la suite de la communication de Roux au Congrès de Budapest, et des mémoires de Roux et de ses collaborateurs, parus dans ces *Annales*, d'où sortait une confirmation si éclatante et une utilisation si pratique des résultats de Behring et Kitasato, l'honorable maire de Palerme eut la louable pensée de se procurer du sérum de Behring, préparé à Höchst.

Les résultats de l'injection dans les vingt premiers cas ont été publiés par un de nous, en collaboration avec M. le Dr Caruso Pecoraro<sup>1</sup>. Depuis, à la suite d'une augmentation des cas de diphtérie dans notre ville, l'administration municipale a créé un hôpital spécial, dirigé par M. le Dr Caruso, où nous sommes chargés des recherches bactériologiques utiles au diagnostic.

Voici le résultat de nos examens<sup>1</sup>.

I. Absence de bacilles de Löffler; présence de staphylocoques, streptocoques, pneumocoques, coli-bacille, 26 cas; Mortalité 2, dont il faut exclure un cas de décès par méningite, soit une mortalité de.....	3,84 0/0
II. Bacille de Löffler, forme pure, 102 cas; mortalité 28, soit..	27,45 0/0
III. Bacille de Löffler et staphylocoque pyogène, 76 cas; mortalité 25, soit.....	32,89 0/0
IV. Bacille de Löffler et streptocoque pyogène, 20 cas, 6 morts, soit.....	30 0/0
V. Bacille de Löffler avec pneumocoque et streptocoque, 7 cas, 3 morts, soit.....	43 0/0
VI. Bâcille de Löffler et coli-bacille; 3 cas, 3 morts, soit.....	100 0/0

Nous avons employé dans ces recherches la méthode recommandée par MM. Roux et Yersin. Mais, dans cette étude minutieuse des associations bactériennes, pour isoler mieux les germes, nous avons employé parfois, en outre des stries en tubes, des cultures sur gélatine en boîtes de Pétri. Même nous ajouterons que dans un cas où les tubes de gélose n'avaient

1. Cette statistique comprend tous les examens des pseudo-membranes qu'on nous a envoyées de l'hôpital. Mais on comprend que la statistique clinique relative à l'influence exercée par l'inoculation du sérum Behring soit tout autre, car il faut exclure les malades qui n'ont pas reçu l'injection, pour être arrivés trop tard à l'hôpital, et ceux qui, ayant reçu l'injection, sont morts moins de 24 heures après leur entrée, et n'ont pu subir l'influence du sérum. Suivant une statistique publiée par MM. les Dr Caruso, Castiglia et Perricone, on a injecté 148 personnes, dont 74 affectées d'angines et de laryngites diphtériques pures, et 74 d'angines et de laryngites poly-microbiennes. La mortalité a été de 29, soit 49 0/0.

pas révélé l'existence du bacille de Löffler, on l'a trouvé sur les plaques de gélatine.

Nous n'avons pas à nous étendre sur les caractères du bacille de Löffler. Pour le coli-bacille, en outre des observations microscopiques et des cultures sur pommes de terre, gélose et gélatine, soit en surface, soit par piqûres, nous avons utilisé la réaction de l'indol, la coagulation du lait, la fermentation des lactoses, et la réaction rose que prennent les milieux de culture à réaction neutre quand on y met de la phénolphthaléine.

III. — Voulant d'autre part savoir ce qu'il fallait penser de cette association avec le coli-bacille, et le nombre de nos cas cliniques étant trop faible pour nous en donner une idée, nous avons eu recours à l'expérience.

Avant tout nous avons eu soin de déterminer la virulence de notre coli-bacille. Avec des cultures de 48 heures dans du bouillon alcalin, tenu à l'étuve à 35°-37°, le degré de virulence peut être fixé à 0,3 c. c. pour 100 grammes de cobaye. En faisant l'inoculation de cette dose dans la cavité abdominale, la mort survenait en 24 heures; avec 0,2 c. c. on avait la mort en 5 jours; avec 0,1 c. c. l'animal résistait, après avoir présenté un peu d'abattement et d'amaigrissement. L'injection de culture de 48 heures filtrée, par voie péritonéale, à la dose de 1 c. c. par 100 grammes d'animal, ne donnait pas la mort. L'animal était abattu et perdait de  $\frac{1}{7}$  à  $\frac{1}{5}$  de son poids initial. Il en était de même pour une injection à la même dose répétée cinq jours de suite, et pour des cultures filtrées d'un mois, gardées à 35-37°.

D'une culture assez virulente de bacille diphtérique, nous avons retiré une toxine qui, à la dose de  $\frac{1}{15}$  de c. c. par 100 grammes d'animal, et en injection sous-cutanée, le tuait en 40 heures;  $\frac{1}{25}$  de c. c. le tuait en 2 jours;  $\frac{1}{30}$  de c. c. le tuait en 3 jours, et  $\frac{1}{35}$  en 4 jours.

a) Ces données établies, nous avons inoculé à 6 cobayes  $\frac{1}{5}$  de c. c. de culture de 48 heures de *bacillus coli* dans la cavité péritonéale, et  $\frac{1}{40}$  de c. c. de toxine diphtérique sous la peau de la paroi abdominale: ces quantités, bien entendu, se rapportent à 100 grammes du poids de l'animal, dont le poids variait de 500 à 700 grammes. Deux cobayes reçurent aux mêmes doses, l'un la culture, l'autre la toxine.

Sur 8 animaux ainsi traités, 6 sont morts en moins de 24 heures.



Celui qui avait été inoculé avec la culture de *bacillus coli* survécut; celui qui avait reçu la toxine mourut après 7 jours. On constata de l'hyperémie péritonéale avec léger épanchement séreux, de l'hyperémie du foie, de la rate et des reins.

Cette uniformité des résultats nous a engagés à répéter l'expérience avec des doses plus faibles :  $1/10$  de c. c. de culture de 48 heures et  $1/10$  de c. c. de toxine diphtérique. Sur six cobayes ainsi traités, 2 sont morts en 48 heures, un en 6 jours, un autre en 7 jours. Deux ont survécu. Deux animaux témoins ayant reçu les mêmes doses, l'un de culture, l'autre de toxine, ont survécu aussi.

Il semble donc que l'injection simultanée de culture et de toxine accélère la mort de l'animal, en superposant les deux virulences, insuffisantes séparément.

b) Quatre cobayes furent inoculés avec  $1/10$  de c. c. d'une culture de 48 heures de coli-bacille, et deux jours après avec  $1/50$  de c. c. de toxine diphtérique; quatre autres reçurent, à ce moment, seulement  $1/50$  de c. c. de la même toxine. Tous ces animaux moururent au bout de 4 à 5 jours de l'inoculation toxique, sans différences notables entre le premier et le second groupe.

c) Les cultures filtrées de coli-bacille dont nous nous servons ne tuent pas les animaux à doses élevées, mais produisent une diminution considérable du poids. Ces conditions nous ont paru bonnes pour rechercher si la diminution de résistance vitale produite par cette toxine rendrait l'organisme plus sensible à la toxine diphtérique.

Quatre cobayes de poids à peu près égal ont reçu en cinq jours, dans le péritoine, chacun 5 c. c. d'une culture filtrée de coli-bacille, âgée de 45 jours. Au bout de ces 5 jours, ils avaient perdu de  $1/6$  à  $1/8$  de leur poids. Le 7<sup>e</sup> jour, ces 4 cobayes et 2 cobayes témoins ont reçu  $1/25$  de c. c. de toxine diphtérique. Ils sont tous morts en 40 ou 60 heures.

La même expérience a été recommencée dans les mêmes conditions, avec 5 c. c. de culture par jour, et  $1/50$  de c. c. de toxine diphtérique le 7<sup>e</sup> jour. Les 6 animaux sont morts en 4 à 5 jours.

Une nouvelle expérience faite de même avec 1 c. c. par jour de culture de coli-bacille et  $1/60$  de c. c. de toxine diphtérique a donné de même 6 morts en 4-5 jours.

L'inoculation de la culture filtrée du coli-bacille semble

donc n'avoir aucune influence sur l'action de la toxine diphtérique, tandis que l'inoculation du coli-bacille en a une.

Le domaine pathologique du *bacillus coli* s'étend de plus en plus. Après avoir été considéré comme un microbe banal, ce bacille nous apparaît comme un ennemi intime, prêt à profiter de toutes les défaillances, et à jouer un rôle dans les affections les plus variées des organes. L'équilibre ordinaire se rompt souvent à son profit, et il se renforce, soit à l'intérieur, soit à l'extérieur de l'organisme. En ce qui regarde la bouche et le pharynx, dont il est l'hôte permanent, il a été donné comme cause de l'amygdalite chronique (Lermoyez, Hélène, Barbier), de l'angine scarlatineuse (Bourges), des syphilides diphtéroïdes de la bouche (Hudelo et Bourges). Widal l'a trouvé associé au streptocoque, dans un abcès du pharynx. Mes expériences montrent qu'associé avec le bacille de Löffler, il aggrave l'infection diphtérique; cette association, quand on la rencontre, aggrave donc aussi le pronostic.

Palerme, avril 1896.



# SUR LE LAIT CONGELÉ

PAR E. DUCLAUX.

---

## I

Tous les moyens qui permettent de transporter, sans danger de le voir se détériorer, le lait à de grandes distances, et de le faire arriver ainsi des régions où il est abondant dans celles où il est rare, méritent d'arrêter l'attention du savant et de l'industriel. De cet ordre est la pratique nouvelle, qui commence à se répandre, et qui consiste à congeler le lait pour le faire voyager sous forme de glaçons.

Si on n'est pas arrivé plus tôt à cette pratique, c'est qu'elle était défendue par un préjugé. On sait par l'expérience des pays froids, dans lesquels l'approvisionnement des villes se fait par des laitières venant le matin de la campagne, que lorsque le lait arrive gelé au consommateur, il a *pris un goût* et n'a plus sa saveur ordinaire. Souvent aussi, il donne moins de crème. Nous allons trouver dans un instant la raison de ces défauts très réels. Mais il est heureux que l'industrie ne les ait pas crus inévitables et ait essayé à nouveau le transport du lait congelé, à l'aide des machines réfrigérantes qui sont devenues si rapidement industrielles.

La maison Gillay, de Lille, expédie par exemple à Paris des caisses simplement fermées par un couvercle, revêtues de fer-blanc à l'intérieur, de façon à être étanches, et contenant chacune des pains de lait congelé, en forme de tablettes plates. D'après les renseignements qui m'ont été très obligeamment communiqués par M. Gillay, le lait est d'abord pasteurisé, puis envoyé dans un bain réfrigérant à 25°, dans une caisse métallique plate. La prise en masse se fait presque immédiatement. Des aiguilles cristallines s'implantent perpendiculairement sur les parois de la caisse et s'étendent de là jusqu'au milieu de la masse, de sorte que lorsqu'on retire la masse de son moule, on a une tablette résistante, plus friable sur son plan médian, c'est-à-dire sur la

surface où les deux assises de cristaux sont venues se rencontrer et s'enchevêtrer. Ces gâteaux sont pourtant très maniables; on les range à côté les uns des autres et debout dans la caisse, en les séparant par un certain intervalle pour qu'ils ne se touchent et ne se soudent pas. Comme ils sont très froids quand ils y entrent, ils y résistent très bien à la fusion, et le transport en chemin de fer se fait comme celui de corps solides. Il faut seulement avoir la précaution de placer toujours à plat, et sans jamais les renverser, les caisses qui les contiennent.

Quelque temps après leur préparation, ces parallélipèdes de glace subissent en apparence une transformation singulière. Ils étaient jaunâtres à l'origine; ils blanchissent et deviennent plus transparents. La région par laquelle commence cette modification est variable. Dans une des caisses que j'avais reçues de Lille, et qui était restée 24 heures à la glacière sans subir de fusion bien sensible, c'étaient les parties les plus hautes du pain qui étaient les plus blanches. La partie inférieure avait au contraire conservé sa teinte normale.

J'ai fait détacher dans le haut et le bas du pain deux bandes de un kilo chacune que j'ai laissé fondre séparément, et que j'ai soumises à l'analyse en distinguant, conformément à la méthode que j'ai donnée <sup>1</sup>, entre les éléments en suspension et en solution. Voici quelques chiffres trouvés :

	PARTIE SUPÉRIEURE		PARTIE INFÉRIEURE	
	Éléments en suspension.	En solution.	En suspension.	En solution.
Matière grasse.....	2,73	—	2,72	—
Sucre de lait.....	—	4,19	—	4,88
Caséine.....	2,56	0,21	3,91	0,34
Phosphate de chaux..	0,17	0,12	0,24	0,16
Sels solubles.....	—	0,28	—	0,36
	5,46	4,80	6,87	5,74
Résidu total.....	10,26		12,61	

En comparant en gros ces deux analyses, on voit tout de suite que le liquide provenant de la fonte de la partie inférieure du pain est plus riche que celui de la partie supérieure. Leur composition à tous deux est normale, mais l'un est plus dilué que le lait initial, l'autre est plus concentré. En se rappelant alors ce qui se passe dans la congélation des mélanges hétéro-

<sup>1</sup>. *Le Lait*. Paris, J. Baillièrre et fils, 1894.



gènes, on voit tout de suite la cause de ce phénomène. Ce qui s'est congelé est surtout de l'eau, dont les cristaux, en s'enchevêtrant, ont retenu, à la façon d'une éponge, une dissolution plus concentrée des matières en dissolution et en suspension dans le lait. L'ensemble peut faire une masse assez solide pour être maniée; mais, en abandonnant au repos ce mélange hétérogène, il se disloque, le liquide concentré des couches supérieures descend peu à peu dans les couches inférieures, et lorsqu'on fait fondre ces couches dont les unes sont appauvries et les autres enrichies, on trouve des différences comme celles que nous venons de relever.

Voilà le gros du phénomène. Mais il présente dans le détail quelques particularités que nous devons noter. Ainsi la matière grasse n'a pas suivi dans son mouvement de descente le lait concentré qui imprégnait les cristaux. Le lait du bas est un peu moins riche en beurre que le lait du haut. C'est que les globules de matière grasse se sont solidifiés à la basse température à laquelle on les a portés, et se sont collés aux cristaux de glace, qu'ils ne quittent qu'au moment où ces cristaux fondent. C'est ce dont on s'aperçoit très bien quand on laisse les prismes de lait congelé se fondre dans la caisse qui les contient. A mesure que la masse se désagrège et se ramollit, le lait concentré qu'elle contient l'abandonne et forme au fond de la caisse une couche que surnagent des glaçons de plus en plus transparents.

Ces glaçons fondent naturellement de préférence par leur partie supérieure, et, à mesure qu'elle s'affaisse, on la voit se couvrir d'une écume de plus en plus épaisse, formée des globules gras, que le travail de fusion a remis en liberté. De là résulte que le lait n'a repris sa constitution initiale que lorsque tout le glaçon est fondu, et nous nous expliquons les changements de goût qu'on relevait parfois dans le lait congelé lorsqu'on allait le puiser dans des vases où la congélation avait été partielle. Ce qu'on retirait à l'état liquide, au début de la fusion, c'était du lait concentré et privé de matière grasse : ce n'était pas du lait normal. Ce qui restait et qu'on retrouvait, une fois la fusion terminée, était au contraire du lait moins concentré qui pouvait arriver à être de l'eau presque pure. Lorsqu'on laisse, au contraire, les glaçons se fondre complètement et qu'on brasse un peu la masse, de façon à en assurer l'homogé-

néité, on ne trouve aucun goût particulier à ce lait congelé. La moindre pasteurisation, même faite avec précaution et à aussi basse température que possible, change le goût bien davantage.

L'étude de la caséine et du phosphate de chaux conduisent aussi à une conclusion intéressante. Ces deux corps existent à l'état de suspension et à l'état de solution, mais la partie en suspension ne l'est pas à la façon de la matière grasse, et adhère plus fortement à l'eau qui l'entraîne avec elle en se retirant. Le phosphate de chaux, à l'état d'éléments très fins et à peine perceptibles au microscope, suit dans son mouvement la caséine dans laquelle il est englobé, et cela explique que les éléments en suspension, autres que le beurre, se comportent comme le sucre de lait ou les sels solubles.

Il ne reste, en effet, presque aucune trace de caséine ni de phosphate de chaux dans les derniers glaçons qu'on trouve flottants à la surface du liquide quand celui-ci est aux 5/6 fondu. En les laissant égoutter pendant quelques instants, pour les débarrasser du liquide qui les baigne, puis en les faisant fondre, on obtient un liquide louche et ayant un peu l'aspect du lait parce qu'il contient une foule de globules gras. Mais ces globules raidis ne passent pas à la filtration, et on en sépare facilement un liquide limpide, incolore. Un de ces liquides, étudié, avait la composition suivante :

Matière grasse.....	0,62 0/0
Caséine, sucre de lait.....	0,02
Cendres.....	0,01

c'était donc de l'eau presque pure, avec un peu de matière grasse en émulsion.

## II

Après avoir fait les constatations qui précèdent, je me suis demandé ce qui arriverait si on maintenait un de ces glaçons de lait dans sa caisse, en le laissant s'égoutter et fondre lentement, et en séparant les divers liquides qui s'en écoulent. On devait avoir, à l'origine, un lait très concentré, puis des laits de plus en plus aqueux, jusqu'à de l'eau pure ou à peine troublée par des globules en suspension.

C'est ce que j'ai fait sur un second envoi. J'en ai retiré, sitôt



que je l'ai reçu, un glaçon du poids de 1 kilogramme environ, que j'ai mis dans un vase de verre dont il ne touchait pas le fond, et que j'ai laissé enfermé dans la caisse, de façon à ce qu'il passe par toutes ses variations de température. Quand il y avait 200 à 250 c. c. de liquide, je le décantais, et j'ai ainsi obtenu 4 produits de fusion dont voici l'analyse :

	1 <sup>re</sup> PARTIE		2 <sup>e</sup> PARTIE		3 <sup>e</sup> PARTIE		4 <sup>e</sup> PARTIE
	Eléments en suspension.	En solution.	En suspension.	En solution.	En suspension.	En solution.	Suspension, solution.
Mat. grasse...	0,24	—	0,10	—	0,18	—	—
Sucre de lait..	—	12,92	—	4,05	—	1,54	0,04
Caséine.....	5,19	0,47	3,13	0,39	0,63	0,28	
Ph. de chaux.	0,22	0,63	0,15	0,27	0,02	0,10	0,01
Sels solubles..	—	0,78	—	0,25	—	0,21	
	5,63	14,80	*3,38	4,96	0,83	2,04	—
	20,45		8,34		2,87		0,05

On voit que les liquides d'écoulement du glaçon étaient à l'origine du lait extrêmement riche, puis, de plus en plus appauvri, de façon à aboutir à de l'eau pure. L'étude de ces liquides est intéressante à divers points de vue.

D'abord, on voit qu'ils sont tous très pauvres en matière grasse. Toute celle qui était contenue dans la masse de lait soumise à l'expérience était, en effet, restée adhérente aux derniers glaçons fondus, et a été séparée par le filtre pour l'étude de la 4<sup>e</sup> partie, de sorte qu'on n'a pas cherché ce qu'il y en avait dans le lait originel. En admettant que, comme dans le lait précédent, il y en avait autant que de caséine, on voit que les premières portions de liquide écoulé auraient contenu de 26 à 28 0/0 de matière solide, c'est-à-dire plus du double de ce que contient le lait normal. La congélation est donc un moyen de séparer d'un coup plus de la moitié de l'eau contenue dans le lait, et on pourrait facilement dépasser cette limite.

Le sucre de lait, la caséine et le phosphate de chaux n'ont pas, dans les trois parties du lait analysées, la même loi de décroissance. En d'autres termes, et en ce qui concerne ces éléments, la seconde et la troisième partie du liquide ne peuvent pas provenir de la dilution de la première avec les eaux du glaçon. De la première à la seconde, la caséine ne tombe pas à la moitié, tandis que le sucre de lait tombe au tiers. Le sucre

de lait s'était donc plus facilement séparé de la masse que la caséine, au commencement de la fonte. Il faut rapprocher cette conclusion de cette autre, mise en évidence dans les chiffres relatifs au phosphate de chaux, que, dans tous les échantillons, la quantité de phosphate de chaux en suspension est plus faible que la quantité en solution. C'est l'inverse dans les laits normaux, où le phosphate en suspension dépasse toujours le phosphate en solution, mais pour peu que le liquide soit acide, le rapport se renverse, et c'est ce qui était arrivé ici. Le lait avait été refroidi après un commencement d'altération qui, en outre, avait donné à la caséine une consistance plus grumeleuse et l'avait rendue plus adhérente aux glaçons.

La distribution des matières entre la partie liquide et la partie solide ne se fait donc pas toujours de la même manière, mais on voit que toujours, pour reconstituer le lait dans toute son intégrité, il faut attendre que tous les glaçons soient fondus. A cette condition, la méthode est excellente. Le lait, parti en bon état, peut arriver en bon état à toutes les distances, et cette solution du problème est bien supérieure à la pasteurisation.

### III

Ce n'est pas tout, et la question peut encore être envisagée à un autre point de vue. Nous venons de voir que dans du lait qu'on refroidit, ce qui cristallise et se sépare à l'état solide, c'est de l'eau, pendant que tout ce qui est en solution ou en suspension dans le liquide se concentre entre les mailles du réseau cristallin. Ne serait-il pas possible de préparer de cette façon du lait condensé?

On sait que ce lait se prépare en ce moment en soumettant le lait à l'évaporation dans le vide. On sait aussi les difficultés nombreuses que rencontre cette évaporation, les appareils compliqués qu'elle nécessite, la saveur qu'elle communique au produit. Il serait évidemment bien plus facile d'enlever l'eau par congélation. Un appareil réfrigérant, une turbine suffiraient à partager le lait en deux parties, une formée d'eau presque pure, une où se trouverait réunie toute la matière alimentaire. De plus, un calcul très facile à faire montre que, si on met en regard les calories négatives nécessaires à la congélation à  $-10^{\circ}$  ou  $-15^{\circ}$



et la force consommée par le turbinage d'un côté, de l'autre les calories positives nécessaires pour évaporer le lait dans le vide fourni par les machines industrielles et la force consommée par ces machines, l'économie est dans la première combinaison.

Il y aurait donc un intérêt industriel à enlever l'eau par la congélation au lieu de la distiller, comme on le fait dans la fabrication du sucre ou du lait condensé. Pour le lait, il est même facile, avec ce que nous savons des propriétés générales du lait, et ce que nous venons d'apprendre dans les chapitres précédents, de dire à l'avance comment vont se comporter les principaux éléments du lait pendant la congélation et le turbinage.

La matière grasse, nous l'avons vu, adhère facilement aux cristaux de glace. La partie restée liquide du lait, en filtrant au travers des mailles du réseau, devra évidemment y laisser quelques-uns de ses globules. De là, une perte d'autant plus fâcheuse que le beurre compte parmi les matériaux du lait les plus estimés. Mais cet inconvénient est facile à éviter en soumettant le lait, avant la réfrigération, à l'écémage centrifuge, qui n'y laisse qu'une quantité très faible de matière grasse qui n'est du reste pas totalement perdue. Une fois le lait amené par congélation au degré de concentration voulu, on lui restitue sa crème.

La caséine est en partie en suspension, partie en solution. Ces deux parties se comportent de même pendant la congélation, et se concentrent toutes deux dans la portion restée liquide. Les cristaux n'en retiennent que ce qu'un cristal retient toujours de son eau mère, c'est-à-dire très peu. On peut encore diminuer la perte provenant de ce chef en empêchant les cristaux de glace de s'enchevêtrer les uns dans les autres, en agitant par exemple le liquide pendant qu'ils se forment.

Le sucre de lait se comporte comme la caséine. Les cristaux bien essorés n'en retiennent que des traces.

Le phosphate de chaux en suspension suit la caséine en suspension avec laquelle il est émulsionné. Le phosphate en solution et les cendres solubles se comportent comme le sucre de lait.

En somme on peut arriver, théoriquement et même pratiquement, comme le montrent les analyses ci-dessus, à ne retirer du lait que de la glace presque pure, et ici la question se posait de

savoir s'il valait mieux turbiner la masse congelée ou la laisser s'égoutter spontanément.

Le second procédé est évidemment plus lent ; mais il dispense de l'emploi des turbines, instruments encombrants et toujours dangereux. La fusion superficielle que subissent les cristaux égouttés a l'avantage de produire un lavage spontané qu'on peut arrêter quand on veut, en surveillant la densité du liquide qui s'écoule, mais le rendement est-il aussi grand par cette méthode que par le turbinage ?

Bien que Paris soit un milieu aussi hostile que possible aux études laitières, j'ai essayé de résoudre cette question avec l'aide d'un jeune ingénieur agronome de l'Institut agronomique, M. P. Pacottet, qui a fait son œuvre avec beaucoup de soin et d'intelligence. Nous n'avions malheureusement à notre disposition qu'un cryogène Cailletet, où il fallait abandonner la congélation à elle-même, sans agiter le liquide, et une petite turbine à main, dont la vitesse maximum restait très éloignée de celle des turbines industrielles. On a opéré sur du lait, acheté et payé comme pur, mais sûrement écrémé, et dont on a fait l'analyse. Deux fractions à peu près égales de ce lait ont été ensuite soumises ensemble dans le cryogène à la congélation. L'une de ces deux masses de glace a été broyée grossièrement, de façon à former une masse sableuse qu'on a turbinée et partagée ainsi en deux parties égales, l'une de lait concentré, l'autre de glace laiteuse. La seconde masse de lait congelé a été broyée de son côté et laissée à égoutter jusqu'à ce qu'elle ait donné la moitié environ de son poids de liquide. Comme l'opération a été faite en juin, il y a eu un peu de fusion des cristaux, dont l'eau a servi au lavage de la masse. Voici les résultats de l'analyse, faite par M. Pacottet, du lait initial et des deux parties soumises à la congélation.

	Lait d'expérience.	500 c. c. Lait turbiné.		550 c. c. Lait égoutté.	
		L. concentré 250 c. c.	Résidu 250 c. c.	L. concentré 250 c. c.	Résidu 300 c. c.
Densité.....	1033	1056	1010	1062	1012
Matière grasse...	2,10 0/0	3,26	0,93	2,81	0,90
Caséine.....	3,74	5,24	2,26	8,59	0,20
Sucre de lait....	3,80	6,10	1,60	6,30	1,40
Phosphate de chaux.	0,37	0,60	0,13	0,58	0,28
Autres sels.....	0,39	0,60	0,18	0,42	0,32
Extrait total....	10,40	15,80	5,10	18,70	3,10

Envisagés en gros, ces chiffres appellent une observation. Ils témoignent d'un rendement industriel tout à fait insuffisant. On ne pourrait pas laisser dans les résidus des quantités de matières aussi grandes, comprenant entre le  $\frac{1}{3}$  et le  $\frac{1}{5}$  des éléments du lait, c'est-à-dire, en tenant compte de la dilution, du  $\frac{1}{6}$  au  $\frac{1}{10}$  de la totalité des matériaux contenus dans le lait soumis à l'expérience. Mais il faut remarquer que nous n'étions pas dans les conditions industrielles. Notre turbine était très faible, les cristaux soumis à l'essorage ou à l'égouttage étaient insuffisamment broyés, et les portions les plus compactes s'essoraient ou s'égouttaient plus lentement et plus difficilement que les autres. Il ne faut donc pas demander à ces nombres la solution de la question industrielle, mais seulement une comparaison entre les effets de l'essorage et de l'égouttage sur un même lait. C'est à ce point de vue que nous allons nous placer pour les envisager.

Les chiffres correspondants aux deux laits congelés ne sont pas immédiatement comparables, le lait égoutté n'ayant pas été partagé comme l'autre en deux parties égales. C'est à cela qu'il faut attribuer la forte proportion de caséine dans les égouts du lait abandonné à lui-même. Mais en remarquant que le résidu du lait égoutté, bien que comprenant une plus forte proportion de la masse que dans le cas du lait turbiné, est pourtant plus pauvre, on conclut, même de cet essai imparfait, que l'égouttage est supérieur au turbinage.

Sur deux points cependant, le lait turbiné l'emporte. Le phosphate de chaux et les sels restent plus abondants dans le résidu du lait égoutté. La raison de ce fait m'échappe. Au sujet de la matière grasse, on peut remarquer que les chiffres, dans les deux fractions du lait égoutté, sont tous les deux inférieurs aux chiffres correspondants du lait turbiné. Il y a donc une perte, qui tient à ce que les globules de beurre restent plus adhérents aux cristaux de glace, quand ils n'en sont pas chassés par le turbinage, et y forment cette sorte de crème que j'ai signalée plus haut, qu'on trouve à la surface du glaçon quand il se fond. Cette perte est facile à éviter par un écrémage préalable à la centrifuge, comme je l'ai indiqué.

En somme, la meilleure pratique, et la plus économique quand on veut obtenir du lait concentré par congélation, est donc de laisser égoutter, en les abandonnant à eux-mêmes, les gla-



cons du lait réfrigéré. Il n'a pas à craindre l'action des microbes pendant cette opération, à cause de sa basse température. On peut à chaque congélation enlever à l'état de glace à peu près pure la moitié de l'eau que contient le lait, et, par conséquent, en 2 opérations successives, obtenir du lait condensé au quart de son volume initial. C'est à peu près le degré de concentration industrielle. Le liquide qu'on obtient ainsi est sirupeux et même visqueux. Sa saveur sucrée est extrêmement accusée, à cause de la concentration atteinte par le sucre de lait. Il est inutile de l'additionner de sucre, car il supporte bien la stérilisation et se conserve ensuite sans s'altérer. Il forme après chauffage une masse un peu plus pâteuse, très facile à délayer dans l'eau. L'industrie du lait condensé pourra peut-être trouver son profit à connaître ces détails, et c'est pour cela que je les publie.

---

## LETTRE DE M. ARMAND GAUTIER

au sujet d'une Revue critique de M. E. Duclaux

parue dans les *Annales de l'Institut Pasteur* (25 avril 1896).

---

Dans une *Revue critique*, publiée dans ces *Annales* (25 avril 1896), M. E. Duclaux, examinant les diverses méthodes destinées à déceler les falsifications des substances alimentaires, arrive à formuler son avis sur la règle que j'ai donnée comme un précieux indice pour déceler l'addition d'eau aux vins rouges. Après avoir dit (comme des autres méthodes, du reste, qui toutes ont la mauvaise fortune d'encourir sa désapprobation), que *cette règle ne mérite aucune confiance*, il ajoute (page 250) :

« Elle table, en effet, sur un état moyen pour un vignoble déterminé, et ne tient compte ni des crus, ni des cépages, ni des différences de maturité au moment de la vendange... Je n'insiste pas sur cette critique qui prend, sans que je le veuille, un air cruel. Je ne peux pourtant pas ne pas dire les défauts des méthodes auxquelles on accorde trop souvent une aveugle confiance et qui ont servi à motiver des milliers de condamnations dont un grand nombre sûrement étaient imméritées... Ne vaut-il pas mieux dire honnêtement au public : Nous ne répondons de rien, nos méthodes pour nous renseigner sont trop imparfaites? »

Ainsi, de par l'autorité de mon excellent confrère de l'Académie, me voici pris en flagrant délit de paternité d'une prétendue règle manifestement bâtarde et fausse, et qui, pis est, responsable de milliers de condamnations imméritées.

Cette sévère censure est-elle justifiée?

La règle à laquelle il est ici fait allusion est celle dite de la *somme alcool-acide*; elle a trait à la recherche très délicate de l'addition d'eau ou *mouillage* des vins. La voici telle que je la donne dans mon petit Ouvrage : *Sophistications et analyse des vins* (4<sup>e</sup> édition, p. 153) :

« Pour les vins rouges les plus différents d'origine et de cépage, la somme des poids de l'alcool et de l'acidité totale\* (calculée en  $\text{SO}^4\text{H}^2$ ), ne varie que dans limites très étroites. En effet, si l'on additionne, pour un vin, le chiffre indiquant son titre alcoolique centésimal et celui qui donne, par litre, le poids en acide sulfurique de son acidité totale, on obtiendra toujours *pour les vins rouges* non additionnés d'eau un nombre égal ou supérieur à 13 et dépassant rarement 17. Cette règle est très générale; elle ne comporte que peu d'exceptions pour les vins de certains cépages assez rares, et que nous indiquons. »

De telle sorte que, sauf quelques cas dont je parlerai plus loin, si cette somme *alcool-acide* est inférieure à 12,5, le vin, s'il est nouveau (car l'alcool et l'acide disparaissent en partie par vieillissement en s'éthérifiant mutuellement), sera généralement mélangé d'eau.

Cette règle adoptée aujourd'hui, avec ces réserves, à la fois par les Conseils du ministère du Commerce, par tous les experts aux tribunaux, par les marchands de vins bien décidés à se défendre, et par les chimistes qui les conseillent, me semble tirer une certaine force de cet unanime assentiment d'intérêts contradictoires, et je pourrais m'en tenir à cet argument. Mais il ne me paraît avoir beaucoup frappé M. Duclaux, et s'il peut être convaincu (Pourquoi pas?), les chiffres suivants l'y aideront certainement.

Voici un tableau où, dans la 3<sup>e</sup> colonne, je donne la moyenne de la somme *alcool-acide*, non pour un cépage ou un cru déterminé, mais pour tous les vins, d'origines les plus diverses, dont j'ai pu me procurer des analyses complètes. Cette 3<sup>e</sup> colonne, colonne des moyennes, en résume des centaines, des milliers peut-être. Dans chacune des séries d'analyses que résume cette 3<sup>e</sup> colonne, j'ai pris ensuite celui de tous les vins analysés où la somme *alcool-acide* était *minimum*, et j'ai formé de ces minimums la 4<sup>e</sup> colonne du tableau. S'il y a des exceptions à ma règle, si le chiffre *alcool-acide* s'abaisse quelquefois pour les vins naturels nouveaux au-dessous du chiffre 12,5, ces exceptions se trouveront inscrites dans la 4<sup>e</sup> colonne du tableau suivant.



TABLEAU RELATIF A LA RÈGLE *alcool-acide*.

ORIGINE DES VINS	AUTEURS DES ANALYSES	MOYENNES DE LA SOMME <i>alcool-acide</i> d'après l'en- semble des analyses connues.	MINIMA DE LA SOMME <i>alcool-acide</i> d'après ces mêmes analyses.
<b>Vins français.</b>			
Vins ordinaires du Médoc. . . . .	Houdart.	44,1	12,50
Vins ordinaires de la Gironde. . . . .	Laborat. municipal. (Documents 1885.)	14,2	13,56
Vins de Bordeaux (grands crus 4 à 10 ans) . . . . .	id. *	43,4	12,11 <sup>1</sup>
Vins de Bordeaux (grands crus, vins âgés de plusieurs années). . . . .	Fauré.	41,5 <sup>2</sup>	
Vins de Bordeaux (entre-deux mers, Côtes) . . . . .	Gayon, Blarez et Dubourg.	44,64	42,9
Vins de Bordeaux (entre-deux mers, Palus) . . . . .	id.	45,78	43,3
Bourgognes (moyenne de grands crus) . . . . .	Vergnette-Lamothe.	45,6	43,0
Bourgognes ordinaires . . . . .	Laborat. municipal.	43,2	42,65
Bourgognes ordinaires, autre série . . . . .	id.	44,7	43,0
Vins de l'Hérault (vins com- muns <i>mélangés d'Aramon</i> ) . . . . .	id.	42,4	41,3 <sup>3</sup>
Vins de l'Hérault (ordinaires, sans ou peu d'Aramon) . . . . .	id.	44,0	42,9
Vins de l'Aude . . . . .	id.	44,7	42,49
Vins du Gard . . . . .	id.	44,0	42,40
Vins de la Loire . . . . .	id.	43,6	41,40 <sup>4</sup>
Vins du Gers . . . . .	id.	44,0	
Vins d'Alsace . . . . .	Goppelsröder.	43,9	43,3
<b>Vins étrangers.</b>			
Vins du Rhin . . . . .	Goppelsröder.	46,0	43,4
Vins de Margraviat . . . . .	id.	43,1	42,9
Vins suisses . . . . .	id.	43,5	42,8
Vins italiens . . . . .	Fausto Sestini.	46,0	42,16 <sup>5</sup>
Vins de Sardaigne . . . . .	id.	48,6	46,5
Vins de Crimée . . . . .	Salomon.	47,3	43,0

1. Vins âgés de plusieurs années auxquels la règle *alcool-acide* ne s'applique plus.

2. Même observation.

3. Les vins mélangés d'Aramon ne répondent pas, ainsi qu'on le verra plus loin, à la règle *alcool-acide*.

4. Probablement, un vin analysé tel qu'on le consomme, c'est-à-dire après quelques années, quand l'alcool et l'acide s'étaient étherifiés.

5. Vin du Haut-Pô, âgé de plus d'un an, envoyé à l'Exposition de Vienne.

Ainsi, sauf le cas des vins vieux de Bordeaux (et la règle *alcool-acide* ne s'applique qu'aux vins de l'année) et celui des vins *mélangés d'Aramon* auxquels la règle ne s'applique plus, ainsi que je l'ai fait observer avec insistance dans mon ouvrage, la moyenne de la somme *alcool-acide* ne s'abaisse jamais au-dessous de 13, fait déjà important à constater. Mais ce qui est plus instructif encore, c'est que si l'on prend l'ensemble des centaines, des milliers peut-être d'analyses de vins authentiques que représente ce tableau, les cas où le minimum de cette somme *alcool-acide* tombe au-dessous de 12,5 sont d'une rareté extrême.

En effet, si de la 4<sup>e</sup> colonne de notre tableau, nous distraions le chiffre 12,1 relatif aux grands crus de Bordeaux généralement analysés tels qu'on les consomme, c'est-à-dire de 4 à 8 ans, et ceux de 11, 3 et 12,40, relatifs aux vins de l'Hérault et du Gard, *mélangés d'Aramon*, deux cas auxquels ma règle ne s'applique plus, comme je l'ai remarqué expressément dans mon *Traité des Sophistications* (4<sup>e</sup> édition, p. 157), il reste le chiffre 12,45, minimum présenté par quelques bourgognes, chiffre qui se rapproche singulièrement de 12,50, et le chiffre 11,40 donné par un vin de la Loire, le seul qui sorte franchement de la règle, mais sur lequel je n'ai pu avoir de renseignements précis, et qui était très probablement un vin vieux.

Ainsi, sur ces milliers d'analyses de vins *de tout cépage, de tout pays, de tout état de maturité*, on ne peut citer que quelques rarissimes analyses faites dans des conditions mal déterminées, peut-être sur des vins vieux, comme des exceptions douteuses à ma règle.

On voit combien est mal fondée l'observation de mon honorable contradicteur, lorsqu'il écrit : « Cette règle table sur un état moyen, pour un vignoble déterminé; elle ne tient compte ni des crus, ni des cépages, ni des différences de maturité. » Si avant de critiquer avec cette assurance un de ses confrères et de lui rappeler ce qu'il devrait dire, suivant lui, *honnêtement* au public, M. Duclaux avait lu la page 154 de mes *Sophistications*, il eut vu que le tableau que j'y donne, était, comme le précédent, établi non sur des moyennes, sur des vins d'un cru, d'une contrée déterminée, mais uniquement sur des cas particuliers fournis par le hasard des analyses sur les crus, les cépages, les contrées les plus variées, françaises ou étrangères.

Du reste, un seul mot suffirait pour établir que je n'ai jamais voulu donner cette règle comme une loi sans appel. A la page 161 de mon petit *Traité*, je dis à propos de cette règle : « Il ne faudrait pas considérer les indications de cette règle comme absolues, *mais comme très probables*. Il est bon de confirmer ce *précieux indice*, surtout dans

les cas limites, par une analyse approfondie des vins, et par les considérations ci-dessus indiquées qu'on tire de cette analyse. »

Ce serait donc bien malgré moi, et malgré mes conseils, qu'on aurait accordé à cette règle une aveugle confiance, et l'on me reprocherait à tort avec mon distingué confrère qui, sans doute, ignorait ces textes et en a quelque regret, *des milliers de condamnations dont un grand nombre étaient imméritées.*

J'ai indiqué la somme *alcool-acide* comme un *précieux indice* du mouillage, et je crois avoir ainsi bien mérité des commerçants honorables qui ont tous accepté cette règle, et des chimistes experts, qui, avant qu'elle ne fût connue, ont pu être conduits quelquefois à conclure à l'addition d'eau d'après le faible poids d'extrait sec comme on le faisait autrefois. Loin d'exposer à des condamnations imméritées, cette règle permettrait aux fraudeurs (si l'on ne corroborait cette précieuse indication par les autres déterminations analytiques) de bénéficier des cas nombreux où la somme *alcool-acide* dépasse notablement le chiffre 13. Mais je n'ai jamais dit ou pensé que cette règle ou toute autre, fût une preuve sans appel. Je suis plusieurs fois revenu dans mon livre des *Sophistications* sur ce principe qu'on ne doit jamais conclure à la fraude d'après un caractère unique, fut-ce la règle *alcool-acide*, malgré sa très grande généralité. A la p. 217 de mon Ouvrage, je dis à ce sujet : L'expert ne doit jamais déclarer qu'un vin est fraudé d'après l'absence ou la constatation de l'un des caractères ci-dessus. Il devra se garder d'affirmer l'addition de telle ou telle matière, sur une réaction unique, fut-elle donnée comme caractéristique. »

Aux *Annales de l'Institut Pasteur*, M. Duclaux s'est particulièrement réservé la critique. Il laisse les savants français ou étrangers faire paraître dans cet excellent Recueil leurs travaux originaux, leurs découvertes ou leurs méthodes. A son tour dans ses *Revue*s fort instructives, pleines de faits, M. Duclaux fait passer à la filière de son esprit subtil les travaux des autres. On vient de voir qu'il ne réussit pas toujours. Pour jouer ce rôle, il faut l'autorité qu'il a, mais il faut aussi une certaine bienveillance ; et je serais presque tenté de me rappeler ce mot de La Bruyère :

« La critique souvent n'est pas une science ; c'est un métier où il faut plus de santé que d'esprit, plus de travail que de capacité, plus d'habileté que de génie. »

Mais mon excellent confrère est une intelligence fine et cultivée ; il ne lui manque ni l'esprit, ni la capacité, et il n'est pas besoin de lui rappeler ses classiques.

ARMAND GAUTIER.



## RÉPONSE A M. ARMAND GAUTIER

---

Je suis désolé que mon excellent confrère, M. le Prof. Armand Gautier, se soit senti atteint par ma critique, car, en vérité, je ne l'avais pas visé. J'avais pris soin de dire en général que je rendais toute justice « aux savants qui s'appliquent à endiguer le torrent des falsifications ». J'avais ajouté que sa méthode « était une des meilleures parmi celles qu'on pouvait employer ». Seulement je la trouvais en même temps insuffisante et dangereuse, et je l'ai dit tout haut, suivant mon habitude, et à mes risques et périls.

Cette confession faite, il m'est impossible de ne pas remarquer que mon excellent confrère aurait pu se dispenser de me répondre, car il me donne raison sur tous les points. J'avais dit que sa règle « ne tenait compte ni des crus, ni des cépages, ni des conditions de maturité ». Au sujet des crus, j'ai son aveu que la règle ne s'applique qu'aux vins jeunes de Bordeaux; au sujet des cépages, j'ai son aveu relatif aux vins mélangés d'aramon. Il est vrai que mon éminent confrère ajoute de suite que les exceptions provenant de ce fait sont « rarissimes ». Pour qui sait la place que l'aramon tient dans le vignoble de l'Hérault, il paraîtra difficile qu'il y ait si peu de vins mélangés d'aramon. Et, en effet, M. A. Gautier n'a qu'à se rapporter aux tableaux analytiques publiés en 1890, à Montpellier, par MM. Roos, Giraud et David, pour se convaincre que les vins mélangés d'aramon sont en majorité.

Ces savants se sont proposé de donner la composition chimique des vins qu'on récolte en grand, dans l'Hérault, et se sont adressés pour avoir des échantillons, non aux vins d'exposition, toujours un peu cuisinés, mais aux échantillons fournis par les comices agricoles et viticoles. Ils ont analysé ainsi 104 vins rouges et 13 vins blancs, parmi lesquels les vins d'essais (hybridations des vignes américaines avec des cépages français) étaient en petit nombre, 5 ou 6 au plus. Les autres étaient des vins de fabrication courante. Or, sur ces 104 échantillons de vins rouges, il n'y en a pas moins de dix qui n'obéissent pas à la règle de M. A. Gautier, et 4 sur 13 vins blancs. Les voici avec leurs numéros :

VINS ROUGES

Numéros.	Cépages.	Alcool.	Acide.	Somme.
31	Piqpoul (Hyb. Bouchet s. Amèr).....	5,8	5,2	11,0
41	Saint-Sauveur.....	7,5	4,6	12,1
62	Aramon sur Jacquez et Riparia.....	7,6	4,5	12,1
63	Divers sur Jacquez et Riparia.....	7,0	4,2	11,2
64	— —.....	7,8	4,2	12,0
66	Aramon sur Riparia.....	7,0	4,9	11,9
70	Divers sur Riparia.....	8,3	4,1	12,4
71	Aramon sur Riparia.....	7,4	4,3	11,7
103	Aramon (submergé).....	6,8	4,9	11,7
104	Aramon alic. Bousch. sur Riparia...	7,0	5,4	12,4

VINS BLANCS

110	Terret-Bouret direct.....	8,0	2,5	10,5
112	Piqpoul direct.....	8,5	3,3	11,8
113	—.....	8,0	3,3	11,3
114	Terret-Bouret direct.....	8,8	3,5	12,3

Je remarque en outre que tous les vins qui n'obéissent pas à la loi sont des vins pauvres en alcool, provenant de moûts peu riches en sucre, et cette remarque suffit pour mettre en jeu les différences de maturité que j'avais relevées dans ma critique.

De sorte que je demande à mon tour : que vaut une règle qui expose à se tromper dix fois sur cent pour les vins rouges, et encore plus pour les vins blancs ? Et ne vaut-il pas mieux, comme je le proposais, que l'administration qu'on a chargée de réprimer les fraudes dise honnêtement au public : « Vous me croyez armée ? il n'en est rien. Protégez-vous vous-même ! »

Je sais bien que M. A. Gautier a toujours dit que sa règle ne méritait pas une confiance absolue. C'est à quoi je faisais allusion, dans mon article, en disant que « les chimistes auteurs de ces règles pratiques ne les avaient présentées qu'avec des réserves que les experts et les tribunaux n'avaient pas comprises ou acceptées ». M. A. Gautier insiste à nouveau sur ces réserves, et demande qu'on corrobore la règle, quand on reste indécis, par « les autres déterminations analytiques ». Mais lesquelles ? Voici « la meilleure » des règles de jugement qui se trompe dix fois sur cent : Combien de fois se tromperont les autres ? Combien faut-il de mauvais arguments pour en faire un bon ? et combien d'incertitudes pour constituer une certitude ?

Quant à l'argument tiré par M. A. Gautier de ce que sa règle est adoptée généralement par les intéressés, je reconnais qu'il est très heureux qu'il l'ait posée, car on pourrait en voir de plus mauvaises, mais en fait elle n'a que la valeur d'une convention. « Vous voulez que les vins que nous lançons dans le commerce obéissent à la loi de M. A. Gautier, disent les grands négociants, qu'à cela ne tienne ! Nous

avons aussi nos chimistes, et nous sommes outillés pour vous fabriquer le type que vous voudrez, quel qu'il soit. Vous n'avez qu'à parler ! Vous avez fait de nous des pharmaciens : nous ne vous demandons qu'un Codex : fiez-vous à nous pour la préparation de nos drogues. Mais si vous vous plaignez, n'oubliez pas que c'est vous qui l'avez voulu. Nous vous donnerions des vins authentiques de Bordeaux, âgés de trois ou quatre ans, ou encore, à meilleur marché, les vins authentiques de l'Hérault analysés plus haut, que les tribunaux nous condamneraient. Alors, nous faisons de la cuisine. » Car voilà à quoi on arrive pour le vin comme pour le lait : la malice des hommes est telle que l'organisation faite pour réprimer la fraude organise la fraude et la rend légale. Beau résultat, ma foi, et qui vaut la peine qu'il donne !

En terminant je voudrais répondre un mot au reproche final que me fait mon éminent confrère de manquer de génie et de bienveillance. Les génies sont rares : M. Gautier le sait aussi bien que moi. Au sujet de la bienveillance, *distinguo*, comme on disait dans l'école. Je ne crois pas avoir jamais manqué, en dix années de critique, à la bienveillance envers les personnes. Quant à la bienveillance envers les idées, j'avoue que je ne sais ce que c'est, ni comment elle pourrait s'accorder avec le progrès scientifique. Nous sommes obligés, pour avancer, de marcher sur les plates-bandes les uns des autres, et tout ce à quoi on est astreint, en pareille occurrence, est de demander pardon de la liberté grande. Ainsi fais-je.

E. DUCLAUX.

---



## REVUES ET ANALYSES

---

### DIGESTION SANS MICROBES

---

#### REVUE CRITIQUE

J'ai déjà signalé aux lecteurs des *Annales* (1895, p. 896) les curieuses expériences de MM. Nuttall et Thierfelder, qui ont réussi à faire vivre pendant quelques jours de jeunes cobayes, extraits aseptiquement de l'utérus de la mère, à l'aide d'aliments stérilisés, dans des conditions de milieu qui éliminaient la présence des germes, de sorte que, pour la première fois depuis que le monde existe, il se faisait chez eux une digestion purement physiologique et sans intervention microbienne. Les animaux ainsi élevés ne se sont pas montrés notablement inférieurs aux animaux nés et élevés dans les conditions ordinaires, ont augmenté de poids, et, de cela, MM. Nuttall et Thierfelder concluent avec raison que l'organisme suffit à son propre travail digestif.

On m'a souvent attribué l'opinion contraire, je ne sais pourquoi. Je m'étais borné à montrer, après avoir prouvé que les diastases digestives ne donnent jamais ni la leucine, ni la tyrosine ou les autres produits aromatiques qu'on rencontre dans les excréments, qu'il fallait admettre, pour les expliquer, une action microbienne intense, que je mettais, d'après quelques expériences, au niveau de la digestion physiologique normale. Je n'ai jamais dit qu'elle se substituât à celle-ci. J'ai donc pu saluer sans arrière-pensée l'intéressant travail de MM. Nuttall et Thierfelder. En voici un autre, qui conduit aux mêmes conclusions sur un animal nourri d'une façon différente.

Les cobayes des premières expériences ne buvaient que du lait stérilisé. Cet aliment ne suffit que les deux ou trois premiers jours. L'animal semble alors éprouver un véritable besoin d'une nourriture solide, qu'il fallait essayer de lui fournir stérilisée. On ne peut pour cela recourir aux racines qui forment son aliment ordinaire. On ne peut les stériliser qu'en les chauffant, et alors le cobaye n'en veut plus.

1. NUTTALL et THIERFELDER. Vie animale sans bactéries dans le canal digestif. *Zeitschr. f. physiologische Chemie*. T. XXII. 1896.

On s'est arrêté à l'emploi d'un biscuit anglais, que le jeune cobaye a consenti à consommer en l'absence d'aliments verts, et qui contenait environ 7 0/0 de substance azotée, 9 0/0 de matière grasse, 17 0/0 de sucre, 58 0/0 de matière non azotée et 0,2 0/0 de cellulose.

Diverses modifications ont été apportées à l'appareil dont nous avons donné en gros la description. On se rappelle que l'animal était placé dans une cloche stérilisée, dans laquelle circulait un air débarrassé de germes. On y mettait l'animal, une provision de biscuit, de la ouate, destinée à former litière. Un large gant de caoutchouc, passant par une large ouverture latérale, permettait de faire à l'intérieur de cette cloche les manipulations nécessaires sans y faire entrer de germes. Le lait était fourni de l'extérieur et arrivait stérilisé à une tétine de caoutchouc que l'animal avait la complaisance de prendre pour une vraie tétine. L'expérience, qui consistait en un repas donné environ toutes les heures, était assez fatigante. En dehors de celles qui ont été contrariées par des accidents, MM. Nuttall et Thierfelder en citent trois ayant porté sur cinq animaux. Je ne citerai à mon tour avec détails que la dernière, la mieux réussie, bien qu'elle n'ait pas été la plus longue.

Trois cobayes ont été extraits par une opération césarienne. Ils étaient à peu près de même grosseur, et pouvaient être considérés comme étant de même poids. L'un a servi d'animal de contrôle. Les deux autres ont été mis chacun dans un appareil et ont commencé à boire du lait 10 heures après, 26 heures après à manger du biscuit. L'expérience a bien marché : les cobayes sont restés vifs, et les précautions prises les ont maintenus secs. On a interrompu l'essai à la fin du dixième jour. Le premier animal avait consommé 710 grammes de lait et pesait 95<sup>gr</sup>,6; le second avait consommé 422 grammes de lait et pesait 83<sup>gr</sup>,5. L'animal de contrôle, pesé au moment de la sortie de l'utérus, et après s'être séché, pesait 72<sup>gr</sup>,5. Conservé 10 heures sans nourriture, il était tombé à 67<sup>gr</sup>,5. Tel était sans doute le poids des animaux d'expérience quand ils ont commencé à s'alimenter, et on peut admettre que le premier avait gagné 28 grammes et le second 16 grammes.

Pour tous deux, le canal intestinal et les excréments étaient sans microbes. Du moins, on en a vainement cherché au microscope et dans des cultures aérobies et anaérobies. A l'autopsie, l'intestin grêle a été trouvé vide, contenant seulement un peu de mucus. Le gros intestin contenait une masse pâteuse jaune. Le cœcum était rempli d'un liquide brun, coagulé à la façon du fromage. Il avait une réaction fortement alcaline. La réaction du gros intestin était faiblement acide. Le contenu de l'intestin grêle l'était fortement.

Les auteurs ont donc le droit de conclure que « des animaux peuvent vivre et croître sans bactéries dans le canal intestinal ». Ils ne veulent pas dire que les bactéries n'interviennent pas d'ordinaire, mais seulement qu'elles peuvent ne pas intervenir. Encore ont-ils soin de remarquer, comme je l'avait fait, que la cellulose, pour laquelle on ne connaît pas de suc digestif physiologique, ne peut se dissoudre, quand elle le fait, que sous l'action des bactéries.

L'augmentation de poids des animaux d'expérience reste inférieure à celle des animaux nés ou élevés dans les conditions ordinaires. Pendant les 40 jours qu'a duré l'expérience, des animaux normaux augmentent de 30 à 50 0/0 de leur poids au moment de la naissance : les deux animaux de l'expérience ci-dessus n'ont augmenté que de 15 à 30 0/0. On ne peut évidemment pas demander à des animaux dont la naissance et l'éducation sont aussi artificielles de se comporter en tout comme des animaux nés à terme et nourris normalement. MM. Nuttall et Thierfelder se sont assurés directement que la substitution du biscuit aux racines, celle du lait de vache au lait naturel, avaient une influence fâcheuse sur la croissance, de sorte qu'en faisant la compensation, ils seraient disposés à conclure que l'absence des bactéries dans le canal intestinal serait plus utile que nuisible. Je ne suis pas éloigné de croire qu'il en est ainsi, et j'en ai dit les raisons dans mon premier article sur ce sujet. Avec des sécrétions digestives normales, on sait où s'arrête le travail d'élaboration de l'aliment dans les intestins : on ne le sait plus quand les microbes interviennent, et une digestion laborieuse est d'ordinaire une digestion toxique.

Il reste un dernier point à vider. J'ai dit (*l. c.*) les conclusions de Baumann au sujet des acides sulfo-conjugés et de l'acide hippurique de l'urine. Baumann les considère comme provenant de la putréfaction intestinale, tandis qu'il considère les oxyacides aromatiques de l'urine comme provenant de l'activité physiologique des tissus. Il est certain que la vie cellulaire de nos organes donne des produits analogues ou identiques à ceux des cellules de microbes. Les produits microbiens de la digestion s'évacuent surtout par les fèces lorsqu'ils sont insolubles ou peu solubles (tyrosine), mais peuvent aussi être absorbés et pénétrer dans l'organisme. Ceux de l'organisme s'en vont par l'urine, mais il y en a de déversés dans l'intestin par le foie, le pancréas et les glandes. Il semble donc bien difficile d'en faire le départ, et c'est précisément ce qui m'avait empêché de conclure nettement au sujet de l'importance relative de la digestion normale et de la digestion microbienne. Du *quantum* de leucine et de tyrosine trouvés dans les excréments, je n'avais pu déduire le *quantum* d'action microbienne. Dans les cas de digestion sans microbes de MM. Nuttall et Thierfelder, la question était



curieuse à reprendre. Ils n'ont eu qu'à évaporer l'eau qui, pendant la durée de l'expérience, avait reçu l'urine et les excréments de leurs animaux, et à y rechercher, par les mêmes procédés que Baumann, les oxyacides aromatiques. Ils en ont trouvé. A cause de la faible quantité d'urine dont ils disposaient, ils n'ont pas pu les identifier, et savoir quels ils étaient. Mais il y en avait, et ils ne provenaient ni du lait, ni du biscuit, ni d'ailleurs. Cela témoigne que, comme l'avait pensé Baumann à la suite d'une expérience sur un chien dont il avait stérilisé le canal intestinal au moyen de calomel, ces acides aromatiques sont formés dans les tissus et peuvent exister en dehors de toute putréfaction intestinale. En revanche, ils n'ont pu trouver, dans les déjections de leurs animaux, ni phénol, ni crésol, ni indol, ni scatol, ni pyrocatechine comme on en rencontre avec les animaux nourris dans les conditions ordinaires. C'est une preuve nouvelle de l'ingérence des actions microbiennes dans le phénomène ordinaire de la digestion. Le degré d'importance de cette digestion microbienne, par rapport à la digestion normale, reste encore à trouver. Il est probable qu'il est variable, mais il serait intéressant de savoir jusqu'à quel chiffre il monte ou s'abaisse dans les cas extrêmes. MM. Nuttall et Thierfelder, qui annoncent l'intention de poursuivre ces recherches, auront peut-être l'occasion d'examiner et de résoudre cette question.

E. DUCLAUX.

---

E. GODLEWSKI. Sur la nitrification. (*Anzeiger der Akad. d. Wissens. in Krakau*, juin 1895.)

M. Godlewski avait montré en 1892 que toute nitrification s'arrête dans une solution d'un sel ammoniacalensemencée avec la nitromnade de M. Winogradsky, lorsqu'on ne laisse arriver au contact de la liqueur que de l'air débarrassé de son acide carbonique par un lavage dans de la potasse, et cela malgré le carbonate de magnésie qu'on est obligé d'introduire dans la liqueur, à la fois pour donner à la monade un aliment dont elle a besoin, et pour maintenir le liquide au voisinage de la neutralité nécessaire. De cela, il avait conclu que les carbonates étaient incapables de fournir au microbe le carbone qu'il fait servir à la construction de ces tissus, et que ce carbone pouvait être fourni par l'acide carbonique de l'air. Cette affirmation avait surpris; on s'était demandé pourquoi l'acide carbonique, qui se dégage constamment du carbonate de magnésie décomposé par les acides provenant de la nitrification, est incapable de faire ce que fait l'acide carbonique de l'air, alors que tous les deux doivent se mélanger dans le liquide que baigne



la nitromonade. L'on s'était demandé s'il n'y avait pas dans l'air quelque substance carbonée, par exemple quelque aldéhyde, absorbable par la potasse comme l'acide carbonique, et qui serait capable de fournir au microbe la petite quantité de carbone dont il a besoin.

Pour éviter cette objection, M. Godlewski recommence aujourd'hui son expérience dans un vase complètement clos, où il peut mesurer à la fin de l'opération les changements survenus, à la fois et corrélativement, dans l'air et dans le liquide.

Quelques expériences préliminaires dans cette direction avaient confirmé les premiers résultats, et montré en outre un fait nouveau, c'est que, pendant le travail de la nitrification, une petite partie de l'azote ammoniacal passe à l'état d'azote libre. Pour étudier avec précision ce phénomène important et complexe, M. Godlewski a imaginé un appareil clos, tout en verre, dans lequel il fait des cultures de nitromonade en présence d'un air tantôt chargé, tantôt débarrassé d'acide carbonique, et dont il connaît, à quelques centièmes de c. c. près le volume total. On fait l'analyse eudiométrique de l'air au début et quand la culture est terminée; on peut donc savoir ce qu'il y avait, au commencement et à la fin, d'oxygène, d'acide carbonique et d'azote.

Une nitrification aux dépens de l'oxygène de l'air comportait une diminution de volume et de pression qu'un manomètre permettait de surveiller; en fait, il n'y en a pas eu dans l'appareil rempli avec de l'air pur. Un accident a empêché d'analyser l'air. Mais on n'a trouvé aucune trace de nitrification dans le liquide. De cela, Godlewski conclut que, contrairement aux résultats de Winogradsky, le carbonate de magnésium ne peut pas servir de source de carbone pour la nitromonade. Il faudrait voir. Il se peut que l'acide carbonique de l'air soit nécessaire pour amorcer la nitrification, c'est-à-dire pour laisser se former les premières cellules qui vont attaquer le carbonate. Mais, à partir du moment où ce carbonate commencera à fournir de l'acide carbonique, on ne voit pas pourquoi cet acide du carbonate, dissous dans le liquide de culture, ne pourrait pas servir d'aliment au même titre que l'acide carbonique de l'air.

Il y a pourtant une autre explication qu'il ne faut pas repousser *a priori*. Nous commençons à voir maintenant que l'identité absolue des molécules chimiques d'un même corps, qui était au fond de toutes les conceptions chimiques il y a vingt ans, n'est pas une chose aussi assurée qu'on le croyait, et qu'entre les molécules d'un corps et celles de ce même corps insolé, par exemple, il y a des différences au point de vue de la stabilité. C'est la notion qui explique le mieux les opérations photographiques, où elle est pourtant rendue un peu confuse par la multiplicité des actions en jeu. Elle est beaucoup plus simple avec

l'acide oxalique qui peut, comme je l'ai montré dans ces *Annales* (t. X), une fois insolé, acquérir et conserver des propriétés nouvelles qui, sans rien changer à la composition de la molécule chimique, en affectent la structure ou au moins la stabilité. Pourquoi l'acide carbonique de l'air, constamment insolé, ne serait-il pas plus instable et plus facile à décomposer que l'acide carbonique des carbonates? C'est une question qu'il vaudrait la peine d'étudier, et que je me permets de recommander aux savants outillés pour ces recherches.

Quoi qu'il en soit, tandis que la culture au contact de l'air privé d'acide carbonique ne commence pas, celle qui se fait en présence de l'air mélangé d'un peu de ce gaz marche d'une façon régulière, et comme la nitrification se fait en vases clos, on peut considérer comme démontré que l'acide carbonique peut être l'unique source de carbone de la nitromonade. C'est un point dont on pouvait, en se montrant pointilleux, il est vrai, douter à la suite des expériences de Winogradsky.

Godlewski confirme les résultats de son prédécesseur en ce qui concerne la production exclusive d'acide nitreux, sans acide nitrique, par la nitromonade. Enfin il confirme en outre son ancienne observation au sujet du dégagement constant d'une petite proportion d'azote, proportion variable, suivant les circonstances, de 2 à 16 0/0 de l'azote ammoniacal transformé. Il est probable que ce dégagement d'azote résulte de la réaction mutuelle de l'ammoniaque et de l'acide nitreux pendant la courte période pendant laquelle cet acide nitreux reste libre, avant d'avoir trouvé le carbonate de magnésie qui doit le saturer. Cette explication est d'accord avec certains résultats de Schloësing et Muntz.

Dx.